

**THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR
DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER**

en Biologie des interactions

École doctorale GAIA

Unité de recherche UMR INTERTRYP

**Étude des bases moléculaires et cellulaires de
la tolérance aux trypanosomoses chez les bovins
par RNAseq**

Présentée par Mélanie Moana PEYLHARD

Le 18 juillet 2019

Sous la direction de Sophie THEVENON

et David BERTHIER

Devant le jury composé de

Philippe JAQUIET, Professeur, ENVT, Université de Toulouse II	Président
Bernard BOUTEILLE, Maître de conférences, CHU et Faculté de Médecine de Limoges	Rapporteur
Thérèse COMMES, Professeur, INSERM, Université de Montpellier	Examineur
David COURTIN, Chargé de recherche, IRD, Université Paris Descartes	Examineur
Nathalie MANDONNET, Directeur de recherche, INRA, Guadeloupe	Examineur

Résumé

La Trypanosomose Animale Africaine (TAA) est une maladie parasitaire (trypanosome) à transmission vectorielle (glossine). En Afrique sub-saharienne elle constitue un obstacle majeur au développement de l'élevage. Toutefois, il existe des races bovines taurines trypanotolérantes capables de tolérer la maladie. Les races européennes et indicines sont trypanosensibles et, sans traitement, meurent généralement de l'infection. Les objectifs de thèse sont d'améliorer les connaissances sur les interactions hôtes-parasites en identifiant les gènes, les réseaux de gènes, les voies métaboliques et les fonctions biologiques associés à la trypanotolérance. Cinq races bovines ouest-africaines ont été expérimentalement infectées par *Trypanosoma congolense*. Des banques RNA-seq ont été réalisées à partir des échantillons sanguins pour caractériser le métatranscriptome au cours de l'infection (bovin+parasite). Les principaux résultats révèlent que l'infection a eu un impact majeur sur le transcriptome des leucocytes bovins quelle que soit la race. Les résultats confirment globalement les données issues de la littérature notamment une activation précoce de la réponse immunitaire innée, suivie d'une activation de la réponse humorale et d'une inhibition des cellules T au stade chronique de l'infection. Des résultats nouveaux ont pu être mis en évidence comme une forte perturbation du métabolisme et de la production d'énergie chez l'hôte. La race N'Dama (trypanotolérante de référence) a présenté une réponse immunitaire plus précoce et plus intense associée à une forte activation de la production d'énergie par les cellules. La race Zébu (trypanosensible de référence) a présenté une forte perturbation du métabolisme des lipides, probablement due à une spoliation par le parasite ou en lien direct avec une dérégulation du métabolisme de l'hôte. En conclusion, j'ai pu mettre en évidence des différences subtiles dans certaines voies d'activation de la réponse immunitaire, et mis en exergue les interactions entre la réponse immunitaire, des modifications métaboliques, et les perturbations induites par les parasites. Ces interactions métabolisme*réponse immunitaire mériteraient des études plus approfondies chez le bovin, pour améliorer le traitement des trypanosomoses.

Mots clés : interactions hôte*parasite, trypanotolérance bovine, RNA-seq, *Trypanosoma congolense*, métabolisme énergétique, ressources génétiques animales

Abstract

Animal African Trypanosomosis (AAT) is a parasitic disease (trypanosome) with vectorial transmission (tsetse fly). In sub-Saharan Africa, it constitutes a major impediment to livestock development. However, there are trypanotolerant taurine cattle breeds capable of tolerating the disease. European and indicine breeds are trypanosusceptible and, without treatment, usually die from infection. PhD objectives are to improve knowledge of host-parasite interactions by identifying the genes, gene networks, metabolic pathways, and biological functions associated with trypanotolerance. Five West African cattle breeds have been experimentally infected with *Trypanosoma congolense*. RNA-seq libraries were constructed from blood samples to characterize the metatranscriptome during infection (bovine + parasite). The main findings reveal that the infection had a major impact on the transcriptome of cattle leukocytes regardless of breed. The results generally confirm the data from the literature including early activation of the innate immune response, followed by activation of the humoral response and inhibition of T cells in the chronic stage of infection. New results could be highlighted as a strong disruption of metabolism and energy production in the host. The N'Dama (trypanotolerant reference) breed showed an earlier and more intense immune response associated with strong activation of energy production by the cells. The Zebu breed (trypanosusceptible reference) showed a strong disruption of lipid metabolism, probably due to spoliation by the parasite or directly related to deregulation of the host metabolism. In conclusion, I was able to highlight subtle differences in some pathways related to the activation of the immune response, and highlighted the interactions between immune response, metabolic changes, and parasite-induced disturbances. These interactions metabolism * immune response deserve further study in cattle, to improve the treatment of trypanosomoses.

Key words: host*parasite interactions, bovine trypanotolerance, RNA-seq, *Trypanosoma congolense*, energy metabolism, animal genetic resources

Remerciements

Je voudrais exprimer ma reconnaissance aux membres du jury. À Monsieur le Docteur Bernard Bouteille, à Monsieur le Professeur Philippe Jaquet, à Monsieur le Docteur David Courtin, à Madame le Docteur Nathalie Mandonnet et Madame le Professeur Thérèse Commes pour avoir accepté de juger ce travail en qualité de rapporteurs et d'examineurs.

Je tiens à remercier ma directrice de thèse, le Docteur Sophie Thévenon sans laquelle je n'aurais sans doute même pas eu l'idée de commencer ce travail et pour son soutien obstiné, sans lequel, je ne l'aurais jamais terminé. Merci pour ton extrême disponibilité et ta joie de vivre.

Je remercie également le Docteur David Berthier pour avoir co-encadré cette thèse. Merci d'avoir su supporter mes doutes et mes hésitations avec une inébranlable bonne humeur.

Merci au Docteur Philippe Solano, Directeur de l'unité mixte de recherche UMR Intertryp, pour m'avoir accueillie dans l'unité.

Merci aussi à tous mes collègues d'unité, en France et à l'étranger, pour les échanges scientifiques (ou pas d'ailleurs !) que j'ai pu avoir avec vous pendant ma thèse. Et puis tous ceux qui ont travaillé sur le sujet et qui m'ont aidée à avancer. Une mention particulière à Cécile, Isa et Laurence pour vous être rendues disponible quand j'en avais besoin.

Je souhaite également remercier les membres de mon comité de thèse.

J'adresse également mes remerciements au CIRAD et à l'IRD pour le financement de cette thèse.

Un immense merci à Véro, Cricri, Philippe pour votre soutien sans faille, votre présence au quotidien et pour n'avoir jamais cessé de m'entourer et de m'encourager. Marie et Rachid, merci d'être là et surtout merci d'être vous ! Ma fin de thèse n'aurait pas été pareille sans les extrémités du couloir.

Et puis il y a ceux avec qui l'aventure a pris forme au Burkina Faso.

Je voudrais adresser ma reconnaissance à toutes les personnes du CIRDES avec lesquelles j'ai travaillé et qui ont fait que mon séjour au CIRDES s'est déroulé dans d'excellentes conditions. Un immense merci à mon vieux père Sylla. Cette thèse, c'est un peu la tienne. J'ai bien cru y laisser ma peau. Charles, merci pour tout ! Et pardon pour toutes les fois où je t'ai ramené l'odeur de l'étable dans ton bureau !! C'était pour la bonne cause. Une pensée particulière pour ma doudou ivoirienne Anique. Notre rencontre n'était pas un hasard, j'en suis certaine. Et puis il y a toutes ces personnes qui ont marqué à jamais mon passage à Bobo, Zotho mon petit, Ida, Abel, Aïcha, mes pintades Carlotta, Olympus et Saimone ! Merci pour tout.

Je voudrais remercier mes collègues de galère, Chloé pour toutes ces sessions BU et ces pauses papotages qui nous redonnaient le moral. Je te rejoins bientôt dans l'after thèse, j'ai hâte ! Merci à mon collègue Jean-Marc l'escroqueur pour les fous rires au bureau. Bon courage pour ta dernière ligne droite et rdv au Cameroun. François Sougal, merci également pour ton soutien et nos sessions BU. Courage pour la suite et surtout n'oublie pas l'espoir, le village, tout ça ! Moustapha, courage aussi. Je te laisse la patate chaude, fais en bon usage. Merci à Maï pour ta disponibilité de l'extrême et ton excellent travail. J'ai eu beaucoup de chance de te rencontrer.

Un immense merci à mes amis pour m'avoir soutenue pendant tout ce temps. Ma jojo, Krum, Pome, Ma crème, Mon petit gué, Mélanie, Chris, Tom, Sandy, Stéphanie, Soso, Chamille, mon gaou, Pep, Myliss, vous me manquez. Il est grand temps que les hostilités reprennent. Mention spéciale au groupe B4 créma pour tous ces moments passés ensemble ! Doudou mwen, menm si sa pa té toujou fasil, nou ké ni toutt tan nou, pou ratrapé kô nou...

Et puis, last but not least, un merci énorme à tous ceux qui, dans ma famille, m'ont supportée, dans tous les sens du terme, et ont continué de m'aimer malgré tout pendant la rédaction de ce manuscrit. Vaea, Matou, Lou, Marie, Alexis, Ronja, Emil, Mamie, merci d'être là. Mais je ne serais pas complètement franche si je n'adressais pas un merci particulier à ma mère, pour son soutien indéfectible de tous les instants, quelles que soient les difficultés. Agite tes pattes ! Et puis Claude, merci du fond du cœur pour tout ce que tu as fait pour moi, pour nous et pour m'avoir permis d'accéder à ton grenier si bien gardé !

A toutes et à tous, merci !

Table des matières

Introduction	15
Première partie : le triangle épidémiologique	19
1 Les trypanosomoses animales	20
1.1 Généralités	20
1.1.1 Contexte.....	21
1.1.2 Répartition	21
1.1.3 Symptômes	23
1.2 Les parasites.....	24
1.2.1 Classification	24
1.2.2 Cycle de développement.....	26
1.2.3 Variabilité antigénique	28
1.3 Les vecteurs	30
1.3.1 Taxonomie et distribution.....	30
1.3.2 Écologie	30
1.4 Diagnostic et lutte intégrée	31
1.4.1 Diagnostic	31
1.4.1.1 Les méthodes directes.....	32
1.4.1.2 Les méthodes indirectes.....	33
1.4.2 La lutte intégrée	35
1.4.2.1 Lutte contre le vecteur	35
1.4.2.2 Lutte par traitements trypanocides.....	38
1.4.2.3 L'usage des races trypanotolérantes	39
1.5 Hôte bovin.....	39
1.5.1 Définition de la trypanotolérance	39
1.5.2 Histoire des races bovines	40
1.5.3 Les races bovines africaines	41
1.5.3.1 Races bovines trypanotolérantes.....	44

1.5.3.1.1	Taurins à longues cornes	44
1.5.3.1.2	Taurins à courtes cornes	45
1.5.3.2	Races bovines sensibles	47
1.5.3.3	Races métisses	47
2	Les bases biologiques de la trypanotolérance chez les bovins	48
2.1	Les mécanismes non immunologiques	48
2.1.1	Facteurs physiologiques	48
2.1.2	Facteurs lytiques	49
2.2	Les mécanismes immunologiques	50
2.2.1	Immunité innée ou non spécifique.....	50
2.2.1.1	Réactions cutanées locales.....	50
2.2.1.2	Activation du complément.....	51
2.2.1.3	Le rôle du système hémoïétique dans la trypanotolérance	52
2.2.2	Immunité acquise ou spécifique	54
2.2.2.1	Réponses humorales et production d'anticorps	55
2.2.2.2	Réponses cellulaires.....	57
2.2.2.2.1	Activation des macrophages	57
2.2.2.2.2	Modulation des lymphocytes T	60
2.2.2.2.3	Rôle des cytokines dans la modulation de la réponse immunitaire	61
3	Déterminisme génétique de la trypanotolérance chez le bovin.....	63
3.1	Approche QTL	65
3.2	Étude d'association	67
3.3	Signature de sélection	67
3.4	Approche transcriptomique.....	68
3.5	Croisement des résultats entre analyse QTL et microarrays.....	70
	Deuxième partie : projet de recherche.....	72
1	Matériels et méthodes.....	73
1.1	Infection expérimentale des bovins	73

1.1.1	Sélection des animaux	73
1.1.2	Critères d'inclusion.....	75
1.1.3	Adaptation à l'étable.....	75
1.1.4	Infection des bovins et choix de la souche de parasite	76
1.1.5	Suivi expérimental.....	76
1.1.6	Extraction d'ARN.....	77
1.2	RNA-seq	78
1.2.1	Principe.....	78
1.2.2	Création des banques RNA-seq et séquençage.....	80
1.2.3	Alignement	82
1.2.4	Quantification des transcrits	85
1.3	Analyses statistiques	87
1.3.1	Différentiel d'expression	87
1.3.2	Structure des contrastes	88
1.4	Analyse fonctionnelle	90
2	Résultats	94
2.1	Phénotype et transcriptomes	94
2.2	Analyses bioinformatiques.....	100
2.2.1	Exploration du jeu de données.....	100
2.3	Analyse du différentiel d'expression des gènes.....	104
2.3.1	Observation globale des données	104
2.3.2	Observations entre les races avant infection (à DPI.0).....	106
2.3.3	Observation au sein des races pendant l'infection (à DPI.20, 30, 40).....	110
2.3.4	Focus sur les gènes les plus pertinents en termes de logFC	115
2.3.5	Gènes DE dans les contrastes intra et inter races	117
2.3.6	Focus sur des cytokines et des marqueurs cellulaires.....	120
2.4	Interprétation biologique.....	126
2.4.1	Analyse fonctionnelle des gènes DE entre les races avant infection.....	126

2.4.2	Analyse fonctionnelle des gènes DE au sein des races pendant l'infection	129
2.4.2.1	Diseases and Functions (DisFun)	129
2.4.2.2	Canonical Pathways (CanPath).....	139
2.4.2.3	Upstream Regulators (UpStream)	144
2.4.3	Analyse fonctionnelle des gènes DE unique à une race	149
2.4.4	Analyse fonctionnelle croisée des contrastes intra et inter races.....	150
3	Discussion	152
3.1	Observation globale des résultats.....	152
3.2	Gènes DE au cours de l'infection	154
3.2.1	Gènes surexprimés dans tous les contrastes	154
3.2.2	Gènes surexprimés.....	156
3.2.3	Gènes sous-exprimés	161
3.3	Analyse fonctionnelle	164
3.3.1	Différences basales entre les races	164
3.3.2	Réponse immunitaire	164
3.3.3	Métabolisme	168
3.3.4	Différences subtiles entre les races.....	177
3.3.5	Limites	181
3.3.6	Perspectives	183
	Conclusion.....	186
	Bibliographie	187
	Annexes	214

Liste des figures

Figure 1 : Carte de distribution géographique du vecteur du genre <i>Glossina</i>	16
Figure 2 : Acteurs du cycle de la trypanosomose animale africaine	21
Figure 3 : Répartition des glossines en fonction des biotopes en Afrique subsaharienne	22
Figure 4 : Estimation de la densité des bovins en Afrique (de 0 en beige à 100-250 bovins/km ² en rouge).....	23
Figure 5 : Caractéristiques morphologiques de l'espèce <i>Trypanosoma congolense</i> dans la circulation sanguine de l'hôte infecté.....	25
Figure 6 : Classification des principaux trypanosomes des mammifères (OMS, 1991)	25
Figure 7 : Cycles évolutifs de <i>Trypanosoma congolense</i> (adapté de (Peacock et al., 2012)) .	27
Figure 8 : Schéma simplifié de la variation antigénique classique chez les trypanosomes dans le sang des mammifères au cours des différentes vagues parasitémiques pendant l'infection (adaptée de (Matthews et al., 2015)).	29
Figure 9 : Aire de répartition des glossines sur le continent africain.	30
Figure 10 : Micro-centrifugeuse à capillaire et lecture de l'hématocrite sur un abaque spécifique (Desquesnes, 2017).....	33
Figure 11 : Itinéraire approximatif de migration et origine du bétail domestique en Afrique (Mwai et al., 2015)..	41
Figure 12 : Distribution des races bovines locales en Afrique subsaharienne (Mwai et al., 2015).....	43
Figure 13 : Carte de répartition des bovins de type taurin, zébu et croisé en Afrique de l'Ouest (Source (Porter, 1991)).....	44
Figure 14 : Équilibre entre la NO synthase et l'arginase et l'effet des macrophages sur les trypanosomes (Vincendeau et al., 2003)	59
Figure 15 : Représentation des zones agro-écologiques d'Afrique de l'Ouest ainsi que des origines géographiques des 5 races bovines utilisées pour l'infection expérimentale	74
Figure 16 : Vue d'ensemble du séquençage Illumina, à partir d'ARN	79
Figure 17 : Extrait d'un fichier .fastq	81
Figure 18 : Extrait d'un fichier BAM/SAM.....	84
Figure 19 : Attribution d'un read à un gène (FeatureCounts)	86

Figure 20 : Structure des 19 contrastes	89
Figure 21 : Schéma regroupant les différentes étapes des méthodes proposées	93
Figure 22 : Suivi de la parasitémie des bovins Lagunaire, Borgou et Zébus Fulani (ou Zébu peul).....	95
Figure 23 : Suivi de l'hématocrite des bovins Lagunaire, Borgou et Zébus Fulani (ou Zébu peul).....	96
Figure 24 : Suivi du taux de leucocyte des bovins Lagunaire, Borgou et Zébu Fulani (ou Zébu peul)	97
Figure 25 : Résumé des résultats de séquençage.....	101
Figure 26 : Séquences alignées sur les génomes du bovin ET du trypanosome	102
Figure 27 : Pourcentage de séquences associées au génome du trypanosome en fonction du temps et de la parasitémie	103
Figure 28 : Analyse multivariée des gènes différentiellement exprimés	105
Figure 29 : Nombre de gènes dits différentiellement exprimés (DE) avant infection	107
Figure 30 : Nombre de gènes différentiellement exprimés (DE) pour chaque contraste au seuil de $FDR < 0,001$	111
Figure 31 : Vue globale des 5270 gènes DE uniques et partagés entre les 5 races bovines (tous temps confondus)	113
Figure 32 : HeatMap sur les logFC des gènes DE, dans au moins un contraste, au seuil de FDR de 10^{-3}	114
Figure 33 : Diagramme de Venn des gènes DE entre les races NDA et ZFU avant infection (ZFU.0-NDA.0) et DE chez la race NDA et/ou la race ZFU au cours de l'infection au seuil de $FDR < 0,001$ (notés NDA.x-0 et ZFU.x-0)	118
Figure 34 : Heatmap sur les logFC des gènes DE avant et au cours de l'infection entre les races NDA et ZFU au seuil de $FDR < 0,001$	119
Figure 35 : Evolution du logFC du gène MARCO au sein des contrastes intra-races	120
Figure 36 : Evolution du logFC des gènes codant des cytokines, des récepteurs de cytokines et des régulateurs de transcription (NFkB) par contraste intra-race.....	123
Figure 37 : Dynamique de l'expression des gènes de CD par contraste	125
Figure 38 : Principales catégories surreprésentées au sein des races au cours de l'infection	132

Figure 39 : Visualisation, sous forme d'une heatmap, des 36 DisFun possédant un z-score ≥ 2 dans au moins un contraste.....	134
Figure 40 : Visualisation, sous forme d'une mosaïque, des 36 DisFun possédant un z-score ≥ 2 dans au moins un contraste avec les p-values (B-H) associées.....	135
Figure 41 : Visualisation, sous forme d'une heatmap, des 67 DisFun possédant un z-score $\leq (-3)$ dans au moins un contraste.....	137
Figure 42 : Visualisation, sous forme d'une mosaïque, des 67 DisFun possédant un z-score $\leq (-3)$ dans au moins un contraste avec les p-values (B-H) associées.....	138
Figure 43 : Visualisation, sous forme d'une heatmap, des 45 CanPath possédant un z-score $\geq 2 $ dans au moins un contraste	142
Figure 44 : Visualisation, sous forme d'une mosaïque, des 45 CanPath possédant un z-score $\geq 2 $ dans au moins un contraste au seuil de B-H p-value $<10^{-2}$	143
Figure 45 : Visualisation, sous forme d'une heatmap, des 88 UpStream possédant un z-score $\geq 2 $ dans au moins un contraste au seuil de p-value $< 10^{-6}$	146
Figure 46 : Visualisation, sous forme d'une mosaïque, des 88 UpStream possédant un z-score ≥ 2 dans au moins un contraste au seuil de p-value $<10^{-6}$	147
Figure 47 : Visualisation, sous forme d'une mosaïque, des 88 UpStream possédant un z-score ≤ 2 dans au moins un contraste au seuil de p-value $<10^{-6}$	148
Figure 48 : Réseau du cholestérol au sein du contraste ZFU.20-0.....	176

Liste des tableaux

Tableau 1 : Extrait d'une table de comptage.....	87
Tableau 2 : Taux d'admixture des animaux de l'expérimentation.....	99
Tableau 3 : Détails sur les 12 gènes DE, leurs FDR et logFC associés, pour les 4 contrastes entre races à DPI.0	109
Tableau 4 : Nombre de gènes DE au seuil de $FDR < 10^{-3}$, par race et par date.....	110
Tableau 5 : Détails sur les 6 gènes DE dans les 15 contrastes intra-races	115
Tableau 6 : Détails sur les gènes possédant les LogFC moyens les plus élevés	116
Tableau 7 : « Diseases and functions » identifiées lors de l'analyse fonctionnelle des gènes DE entre les races avant infection au seuil de $p\text{-value} < 0,001$	127
Tableau 8 : « Upstream Regulators » identifiés lors de l'analyse fonctionnelle des gènes DE entre les races avant infection au seuil de $p\text{-value} < 0,001$	128
Tableau 9 : Top 5 des DisFun obtenues lors de l'analyse fonctionnelle des gènes DE au sein des races au cours de l'infection	130
Tableau 10 : CanPath enrichies au seuil de B-H value $< 0,01$ dans au moins un contraste ($-\log_{10}(B\text{-H value})$).....	140
Tableau 11 : Fonctions associées au métabolisme énergétique chez la race NDA à partir de DPI.30	150
Tableau 12 : Récapitulatif des valeurs obtenues par catégories pour le cholestérol	169

ABREVIATIONS

ADNc : Acide Désoxyribonucléique complémentaire

ANR : Agence Nationale de la Recherche

ARNm : Acide Ribonucléique messenger

B-H : P-value corrigée par la méthode de Benjamini et Hochberg

BTA: *Bos Taurus* chromosome

CIRDES : Centre International de Recherche-Développement sur l'Elevage en zone Subhumide

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CD : cluster de différenciation

DPI : Day post-infection (Jours post-infection)

DE : différentiellement exprimés

kD : kilodalton

ELISA: Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay

EST: Expressed Sequence Tag

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture)

FDR: False Discovy Rate

GPI: Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol

Hb: Hémoglobine

IFN γ : Interferon Gamma

IgG : Immunoglobuline G

IgM : Immunoglobuline M

IL : Interleukines

ILRI: International Livestock Research Institute

LogFC : Log Fold Change

NK : Natural Killer cells

NTTAT: Non Tsétsé Transmitted Animal Trypanosomosis

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cell (cellules mononuclées du sang périphérique)

PCR: Polymerase Chain Reaction

PCV : Packed Cell Volume, c'est-à-dire l'hématocrite

QTL: Quantitative Trait Loci ou locus à traits quantitatifs

RT-qPCR: Real Time quantitative PCR

RNA-seq : séquençage global à haut débit des ARNm

SAGE: Serial Analysis of Gene Expression

SNP: Single-Nucleotide Polymorphism (polymorphisme nucléotidique ou polymorphisme d'un seul nucléotide)

Syn. : synonyme

T CD4 : Lymphocytes T CD4

T CD8 : Lymphocytes T CD8

TAA: Trypanosomose Animale Africaine

TCR : T Cell Receptor

TDR : Test de Détection Rapide

THA: Trypanosomiase Humaine Africaine

TNF α : Tumor Necrosis Factor *alpha*

VAT: Variant Antigénique des Trypanosomes

VI: Volontariat International

VSG: Variant Surface Glycoprotein

Introduction

La trypanosomose animale africaine (TAA) est une maladie à transmission vectorielle causée par un protozoaire parasite du genre *Trypanosoma*. Ce parasite, le trypanosome, est transmis par un insecte vecteur hématophage du genre *Glossina*, plus communément connu sous le nom de mouche tsé-tsé. Alors que l'homme n'est infecté que par 2 sous espèces de trypanosomes du genre *Trypanozoon* (*Trypanosoma brucei gambiense*, 95 % des cas ; *Trypanosoma brucei rhodesiense*, 5 % des cas) (Franco et al., 2014), les trypanosomes affectant les animaux appartiennent à 6 sous genres donc 3 comprennent des agents pathogènes majeurs qui affectent le bétail dans les zones humides et subhumides d'Afrique : *Trypanosoma congolense* (sous-genre *Nannomonas*), *T. vivax* (sous-genre *Duttonella*) ainsi que *T. brucei brucei* (sous-genre *Trypanozoon*) (Uilenberg and Boyt, 1998).

La distribution de cette maladie est étroitement associée à celle du vecteur et s'étend, en Afrique subsaharienne, sur une surface de plus de dix millions de km² (FAO, <http://www.fao.org>). Actuellement, aucun vaccin n'est disponible et les mesures de lutte reposent essentiellement sur le contrôle du vecteur et l'utilisation de traitements trypanocides prophylactiques et curatifs. Malgré leur efficacité à court terme, ces traitements nécessitent des applications régulières (molécule non rémanente) et une réduction de leur efficacité est de plus en plus observée du fait de la résistance croissante des trypanosomes aux trypanocides employés (Mulandane et al., 2018).

En raison de la forte mortalité qu'elle occasionne, cette maladie constitue un obstacle majeur au développement de l'élevage dans ces zones d'enzootie qui comptent parmi les zones les plus fertiles du continent africain.

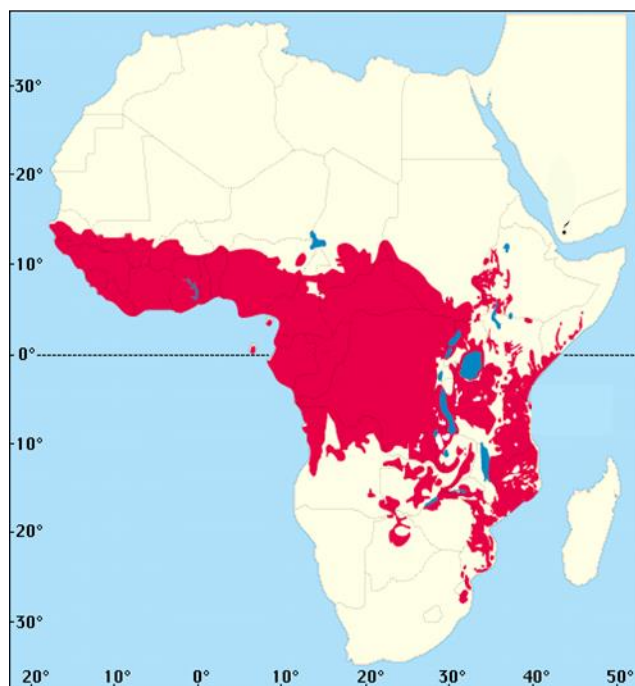


Figure 1 : Carte de distribution géographique du vecteur du genre *Glossina*
(Source : Logiciel d'identification CIRAD-Orstom)

Selon l'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), environ 50 millions de bovins vivraient dans des zones à risques trypanosomiens dans plus de 37 pays (Budd, 1999). Les pertes annuelles directes (mortalité des animaux, baisse de la fécondité, baisse de production en viande, lait...) et indirectes (non-utilisation des terres, impact sur la structure du troupeau, faible voire absence d'utilisation de la traction animale) sont estimées à 4,5 milliards de dollars ((Kristjanson et al., 1999), (Shaw, 2004), (Mattioli et al., 2004)).

Il existe pourtant, en Afrique de l'Ouest, des races bovines taurines (*Bos taurus*) capables de tolérer la maladie. Ces races s'infectent comme les autres mais présentent la capacité de contrôler la prolifération des parasites ainsi que les effets pathogènes qui leurs sont associés, ce qui leur permet de rester productives dans ces zones d'enzootie. Cette aptitude particulière, appelée trypanotolérance (Murray et al., 1984) est, sans doute, la conséquence de l'effet de la pression de sélection exercée par les parasites sur les premières populations bovines qui ont colonisé les aires endémiques de la maladie. A l'inverse, les races bovines indicines (*Bos indicus*) et européennes, moins adaptées, meurent généralement de l'infection en l'absence de traitement.

Des travaux antérieurs ont montré que la trypanotolérance est un caractère héritable et sous contrôle multigénique ((Hanotte et al., 2003), (Van der Waaij et al., 2003)). Néanmoins, les bases génétiques de la trypanotolérance restent encore méconnues et seules quelques études ont émis des hypothèses sur le rôle potentiel de certains gènes ((Dayo et al., 2009), (Dayo et al.,

2012), (Berthier, 2009), (Gautier et al., 2009), (O'Gorman et al., 2009), (Noyes et al., 2011)). Bien qu'il existe une grande diversité de races bovines en Afrique de l'Ouest, seules les races de référence trypanotolérante N'Dama et trypanosensible Zébu Boran ont été largement étudiées. Une partie importante des races locales, dont certaines sont connues par les éleveurs eux-mêmes pour présenter des degrés de tolérance variable, reste donc encore sous-(voire non) étudiée. Ces races locales pourraient contribuer à la compréhension et la caractérisation de la tolérance bovine mais constituent également une richesse en termes de biodiversité qu'il convient de mieux caractériser et préserver.

D'un point de vue général, la trypanotolérance est un bon exemple pour comprendre les bases génétiques de l'adaptation de certaines races bovines à une maladie parasitaire. D'un point de vue plus spécifique, l'étude moléculaire fine des interactions entre les cellules immunitaires de l'hôte et le parasite contribue à mieux comprendre les mécanismes d'adaptation du parasite à son hôte (et vice versa) et les moyens qu'il déploie pour contourner le système immunitaire. In fine, ces résultats pourraient concourir à développer des outils prophylactiques ou thérapeutiques ou à supporter la mise en place de programmes d'amélioration génétique afin de mieux contrôler la maladie.

Objectifs de la thèse

Les objectifs généraux de cette thèse sont d'identifier les bases moléculaires de la tolérance à la trypanosomose chez cinq races bovines d'Afrique de l'Ouest (présentant des degrés de sensibilité/tolérance différents) expérimentalement infectées par *Trypanosoma congolense* et d'améliorer les connaissances sur les interactions hôte-parasite. L'approche choisie est une étude méta-transcriptomique (hôte et parasite) visant à l'analyse des données de séquençage haut débit des ARNm (RNA-seq) du tissu sanguin des bovins avant et au cours de l'infection. Cette approche, sans *a priori*, permettra d'avoir une vue exhaustive du niveau d'expression des gènes au cours de l'infection mais également d'avoir accès au même moment aux transcriptomes de l'hôte bovin et du parasite. L'analyse fonctionnelle approfondie des gènes différentiellement exprimés, à l'aide du logiciel Ingenuity Pathway Analysis (IPA[®]), nous permettra d'identifier non seulement les voies biologiques et les réseaux de gènes enrichis mais également de déduire leur état d'activation ou d'inhibition au cours de l'infection.

Les objectifs plus spécifiques sont :

- 1) d'évaluer le phénotype trypanotolérant de cinq races bovines ouest-africaines

- 2) d'identifier *in vivo*, à partir des données RNA-seq, les gènes différentiellement exprimés au cours de l'infection par les leucocytes en fonction des races bovines,
- 3) d'effectuer une analyse fonctionnelle des gènes différentiellement exprimés pour identifier les voies biologiques mises en œuvre par les différentes races bovines pour réguler l'infection

et

- 4) de proposer des gènes candidats ou des fonctions biologiques associés à la trypanotolérance.

**PREMIERE PARTIE :
LE TRIANGLE EPIDEMIOLOGIQUE**

1 Les trypanosomoses animales

1.1 Généralités

Les trypanosomoses animales sont des affections parasitaires regroupant trois maladies :

i) **la nagana** ou trypanosomose animale africaine (TAA), dont les parasites (*Trypanosoma congolense*, *Trypanosoma brucei brucei*, *Trypanosoma vivax* essentiellement) sont transmis par des vecteurs biologiques, les glossines, mais aussi par des vecteurs mécaniques (*Trypanosoma vivax*),

ii) **le surra** dû à *Trypanosoma evansi*, transmis par les tabanides et les stomoxes (vecteurs mécaniques), et

iii) **la dourine**, due à *T. equiperdum*, à transmission vénérienne chez les chevaux.

En raison de leurs particularités, l'épidémiologie et la distribution géographique de ces trois maladies diffèrent et on parlera de Trypanosomoses animales africaine (TAA), confinées au continent africain et de Trypanosomoses non transmises par les glossines (NTTAT : Non Tsétsé Transmitted Animal Trypanosomosis) qui se retrouvent hors Afrique (Asie, Amérique Latine...). La suite de mon travail de thèse et mon manuscrit ne traiteront que de la nagana.

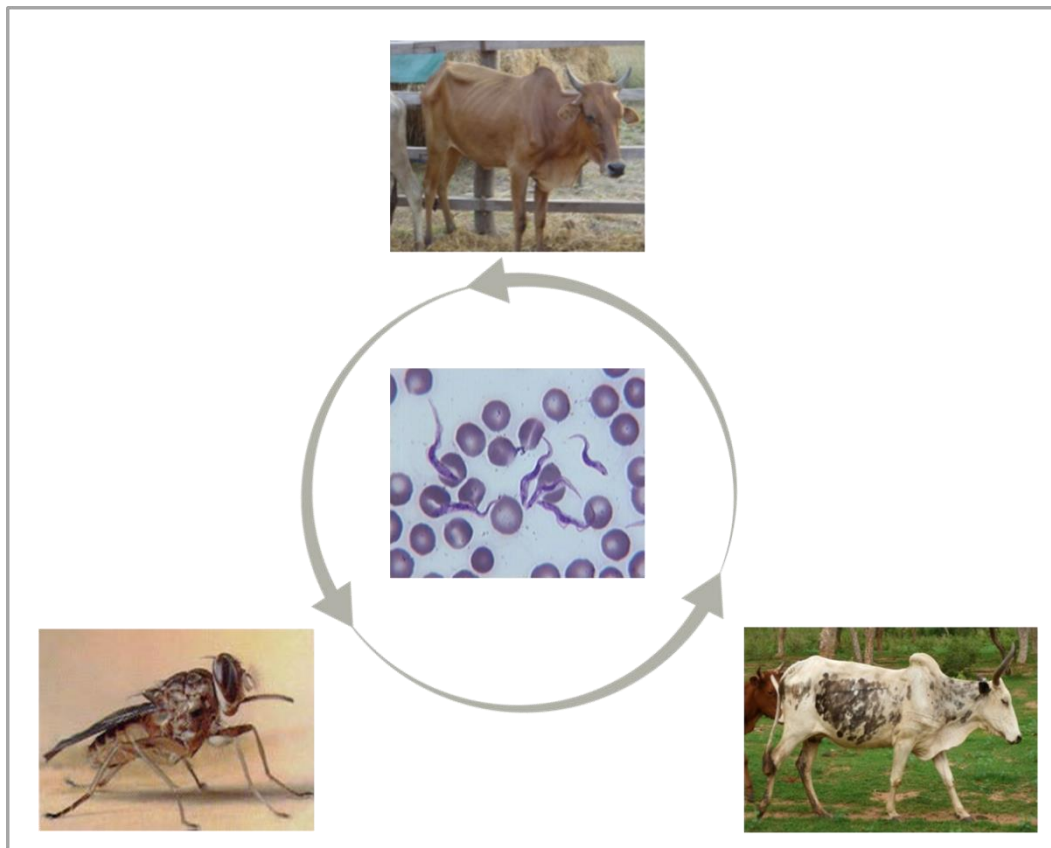


Figure 2 : Acteurs du cycle de la trypanosomose animale africaine

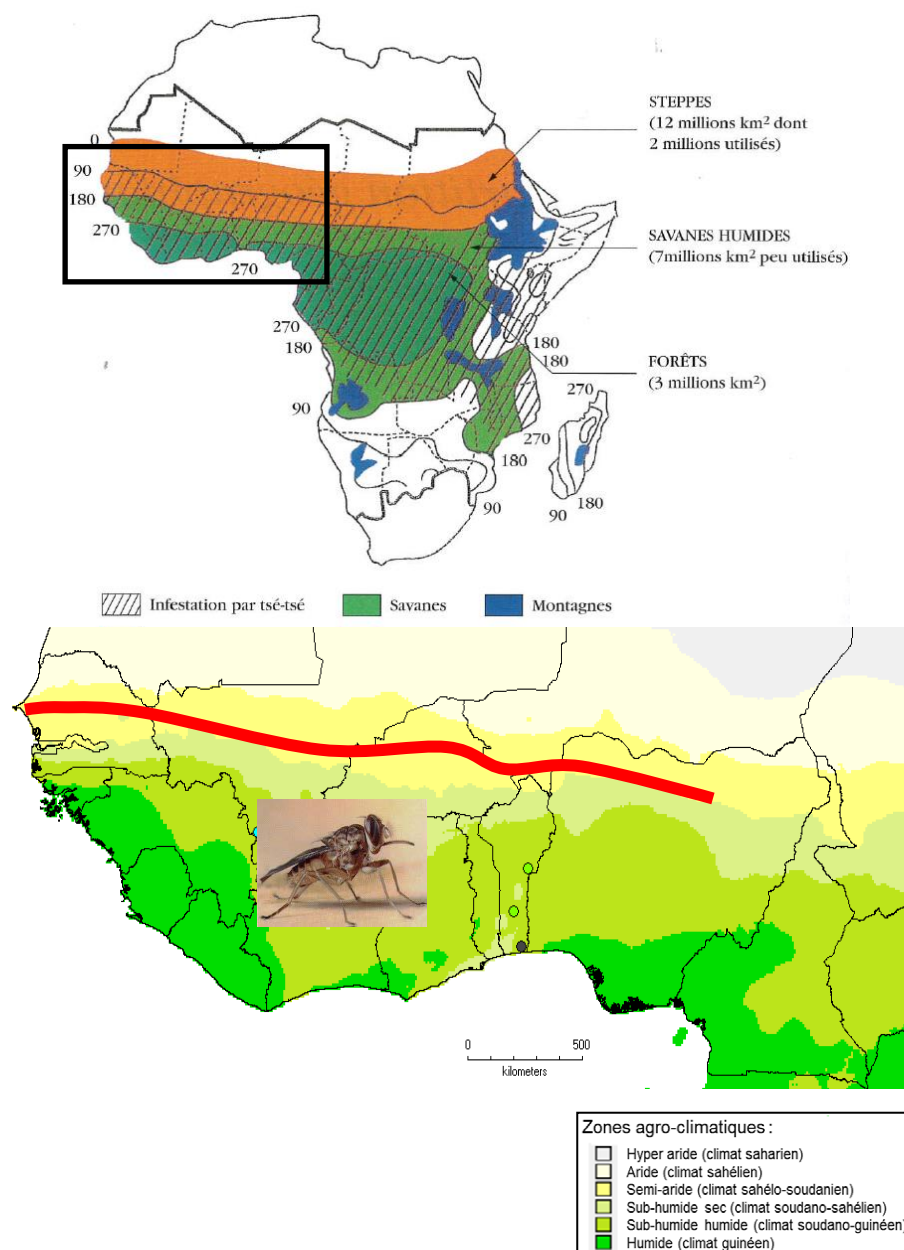
Photo : Zébu infecté (© S. Thévenon), parasite (© I. Sidibé), glossine (© S. Ravel), Zébu sain (© M. Peylhard).

1.1.1 Contexte

Le continent africain tout entier est confronté au défi grandissant de satisfaire de manière autonome les populations locales en produits d'élevage, en particulier en viande et en lait. Les espèces domestiquées jouent donc un rôle crucial pour répondre à cette demande. Malheureusement, la trypanosomose menace la santé humaine comme la santé animale, ainsi que la production agricole et, par voie de conséquence, le développement rural et la réduction de la pauvreté en Afrique subsaharienne ((Kristjanson et al., 1999), (Shaw et al., 2014), (Alsan, 2015)). Malgré son impact dramatique, cette maladie tropicale est dite négligée selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (Roger et al., 2017). Cela signifie qu'elle ne mobilise guère les financements des bailleurs de fonds, en grande partie parce qu'elle ne menace pas directement l'élevage industriel des pays les plus riches.

1.1.2 Répartition

L'aire de répartition de la nagana suit celle de son vecteur, la glossine. La répartition des glossines sur le continent Africain est représentée dans la Figure 3.



Ainsi, en Afrique de l'Ouest, on trouve différentes conditions agro-écologiques et climatiques qui vont permettre ou non la survie et la prolifération du vecteur. Au nord, au niveau de la zone sahélienne, les conditions arides et les températures élevées limitent sa présence (limite représentée ici sur la Figure 2 par la ligne rouge). A l'inverse, plus on descend vers le sud en passant par les zones de savanes jusqu'aux forêts humides, plus les conditions vont être favorables à la prolifération des espèces de glossines. On peut trouver ponctuellement des habitats favorables aux glossines dans les cordons ripicoles (i.e. en bordure des eaux courantes),

qui génèrent un microclimat humide, entourés de zone semi-aride. Il a été montré notamment que, dans une région du Burkina Faso (région de la boucle du Mouhoun), le type de végétation le long des berges du fleuve est un facteur important déterminant la répartition et l'abondance des glossines riveraines (Bouyer et al., 2015).

Si on compare la carte de présence des glossines à celle de la densité estimée des bovins (voir Figure 4), une tendance à l'exclusion des bovins dans les zones à tsé-tsé émerge : si les bovins sont bien entendus absents des zones désertiques, leur densité est maximale en bordure de la zone à tsé-tsé, et décroît à mesure qu'on s'enfonce dans les zones d'endémies des glossines.

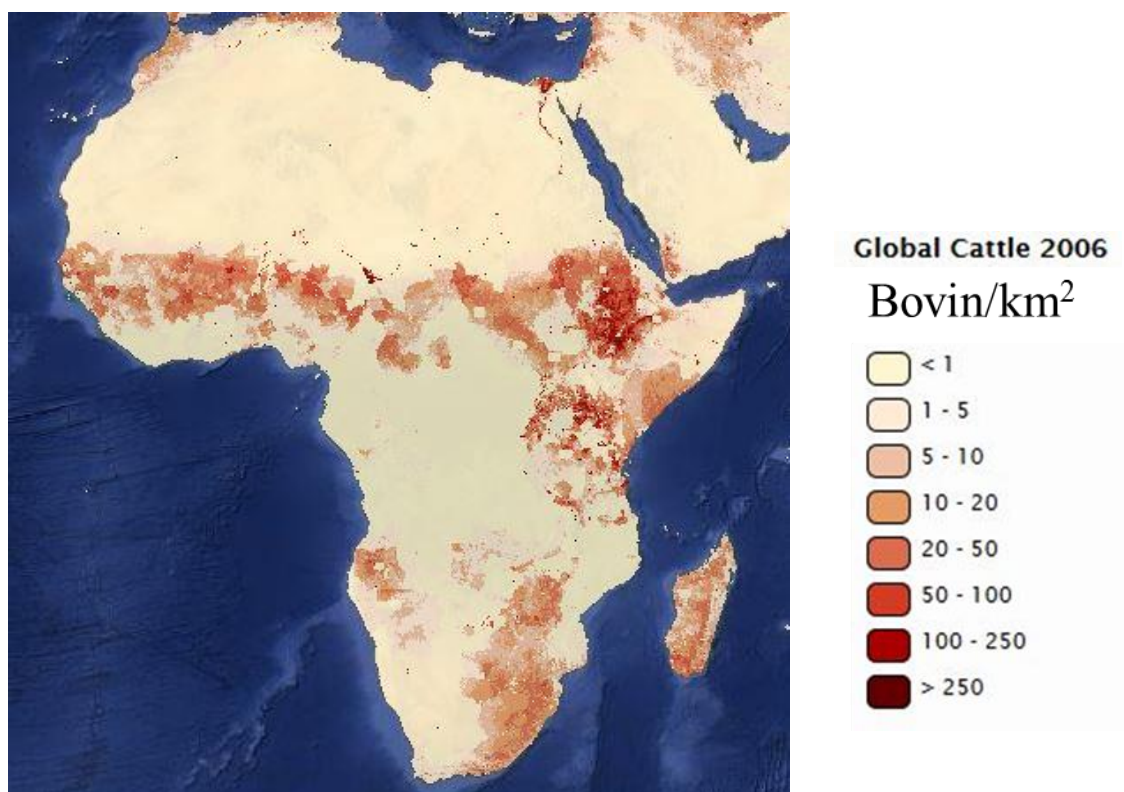


Figure 4 : Estimation de la densité des bovins en Afrique (de 0 en beige à 100-250 bovins/km² en rouge)

Soucre : <https://livestock.geo-wiki.org/> (data: Tim Robinson ILRI, Giulia Conchedda FAO et International Institute for Applied Systems Analysis).

1.1.3 Symptômes

Pendant les premiers jours qui suivent la piqure par une mouche tsé-tsé infectante, les trypanosomes entraînent, au niveau du site d'injection, une réaction inflammatoire formant ainsi un chancre d'inoculation (Dwinger et al., 1987). Cette formation cutanée est souvent peu perceptible chez les bovins. Les trypanosomes envahissent ensuite rapidement la circulation générale. La maladie qui en découle peut évoluer sous deux formes, chronique ou aiguë, en fonction du statut de susceptibilité de l'animal (cf. 1.5.1), associé à des facteurs génétiques et

physiologiques intrinsèques (i.e. gestation) ou extrinsèques (i.e. ressources alimentaires disponibles, conduite d'élevage, présence d'autres maladies...) et de la virulence et la pathogénicité de la souche ((Courtin et al., 2008), (Bengaly, 2003), (Kabore et al., 2017)).

L'infection aiguë provoque la mort de l'animal en quelques jours (comm. personnelle S. Thévenon : la souche *T. congolense* du Burkina Faso dite « Samendeni » a tué 3 bovins sur 4 en 9 jours) ou semaines mais généralement les trypanosomoses bovines évoluent vers des formes chroniques (mortalité en plusieurs mois voire années) ((Authié et al., 1999), (Berthier, 2009)).

Les symptômes sont aspécifiques et ne permettent pas de poser un diagnostic de TAA. Le symptôme principal de la trypanosomose chez les bovins est l'anémie. Cette anémie résulte d'une hémolyse extravasculaire massive, dans la rate, le foie et dans la circulation systémique (Facer et al., 1982). Elle est accompagnée d'une hyperthermie importante ainsi que d'une dégradation progressive de l'état général de l'animal : pâleur des muqueuses, perte d'appétit entraînant une faiblesse profonde ou cachexie et conduisant à la mort des individus les plus sensibles. Les mammifères sauvages ainsi que certaines races bovines africaines possèdent un certain degré de tolérance à l'infection. Les parasitémies dans le sang peuvent varier de 10^4 à 10^8 trypanosomes par ml de sang en fonction de la virulence et de la pathogénicité de l'espèce de parasite présente (Murray et al., 1990).

1.2 Les parasites

1.2.1 Classification

Les trypanosomes sont des parasites protozoaires uniflagellés du genre *Trypanosoma* appartenant à la famille des *Trypanosomatidae* et à l'ordre des *Kinetoplastida* en raison de la présence, dans leur cytoplasme, d'un organite particulier, le kinétoplaste, prolongement d'une mitochondrie et comportant de l'ADN (voir Figure 4) (Vickerman, 1969). Les espèces d'importance médicale et vétérinaire sont généralement hétéroxènes ce qui signifie qu'elles ont besoin, au cours de leur vie, de plusieurs hôtes successifs (un hôte invertébré intermédiaire ainsi qu'un hôte vertébré définitif) pour compléter leur cycle évolutif. L'hôte définitif, également appelé hôte primaire, est un hôte au sein duquel le parasite atteint sa maturité et effectue sa reproduction sexuée. L'hôte intermédiaire ou hôte secondaire, est un hôte chez lequel le parasite va subir une évolution larvaire et/ou va effectuer sa reproduction asexuée.

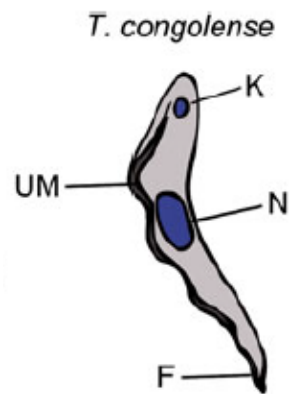


Figure 5 : Caractéristiques morphologiques de l'espèce *Trypanosoma congolense* dans la circulation sanguine de l'hôte infecté

(K) kinétoplaste, (UM) membrane ondulante, (N) noyau, (F) flagelle. Longueur 9 — 22 μm . Adapté de (Giordani et al., 2016).

Basé sur le mode de transmission de leur insecte vecteur, le genre *Trypanosoma* est scindé en deux groupes : les *Stercoraria* (3 sous-genres), dont la transmission des formes infectantes se fait par les déjections fécales de l'insecte vecteur et les *Salivaria* (5 sous-genres) dans lesquels les parasites sont transmis par inoculation avec la salive du vecteur lors du repas sanguin (voir Figure 6) (Hoare, 1966).

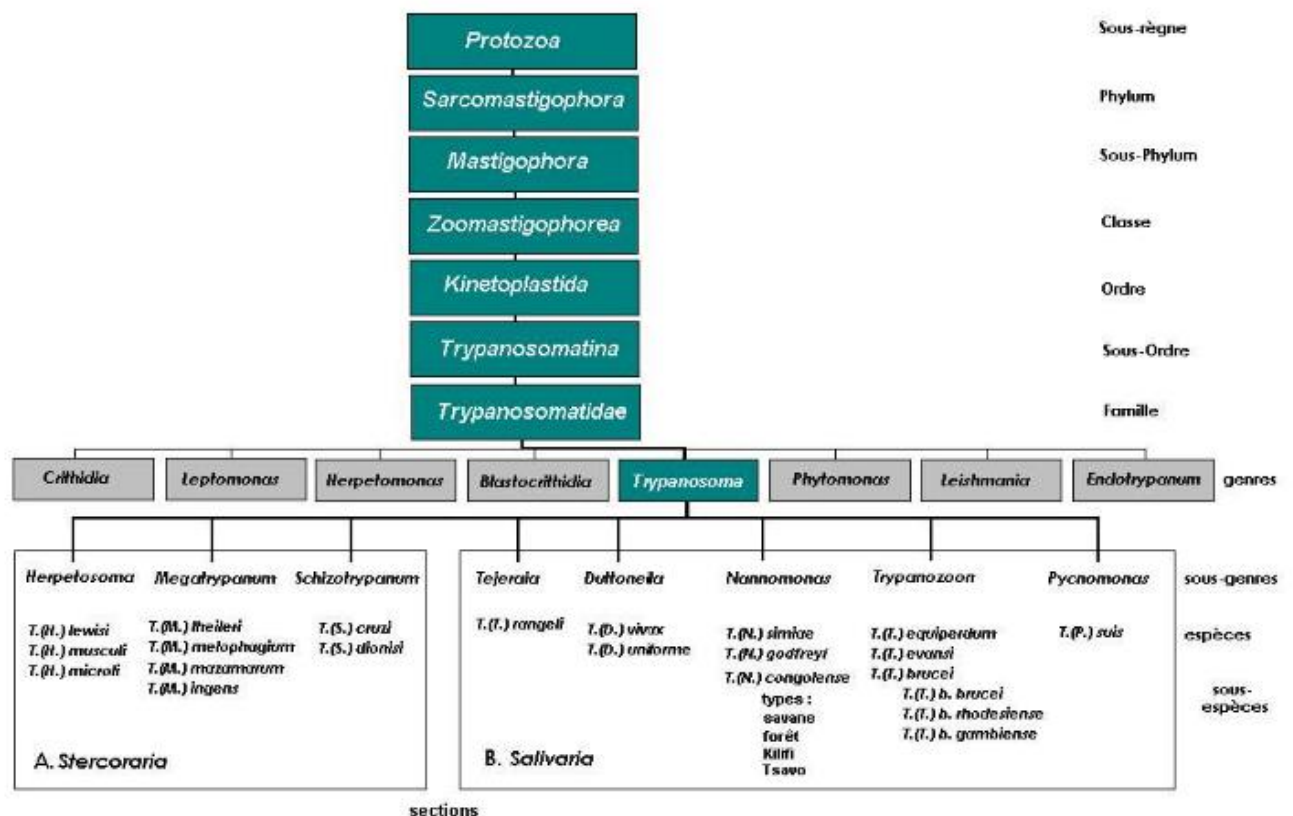


Figure 6 : Classification des principaux trypanosomes des mammifères (OMS, 1991)

Parmi la grande famille des Trypanosomatidés se trouvent des agents pathogènes majeurs responsables de maladies extrêmement graves affectant l'homme et l'animal en milieu tropical.

On trouve notamment les parasites responsables de la Trypanosomose Humaine Africaine (THA) plus connue sous le nom de maladie du sommeil (sous-genre Trypanozoon ; espèce *Trypanosoma brucei*, sous-espèces *Trypanosoma b. gambiense* et *T. b. rhodesiense*), des leishmanioses (genre *Leishmania*, espèces *L. donovani*, *L. infantum* et *L. chagasi*), de la maladie de Chagas (sous genre *Schizotrypanum*, espèce *T. cruzi*) et également des trypanosomoses animales (TAA). Les trypanosomes appartenant au groupe *Salivaria* sont extracellulaires et se multiplient essentiellement dans le sang chez leur hôte vertébré, alors que les espèces du genre *Leishmania* ainsi que *T. cruzi* possèdent des stades intracellulaires. Tous les trypanosomes pathogènes africains appartiennent au groupe *Salivaria* (Rotureau and Van Den Abbeele, 2013). Chez les bovins, il existe trois espèces pathogènes majeures, il s'agit de *Trypanosoma congolense*, *T. vivax* et *T. brucei brucei*. La pathogénie de ces trois espèces est variable. *T. congolense* est le plus petit des trypanosomes pathogènes, d'une longueur de 9–22 µm. Lors d'une infection par une souche de *T. congolense*, la parasitémie se développe, en moyenne, 7 à 11 jours après l'infection (dpi). Au sein de l'espèce *T. congolense*, on a identifié 3 types qui sont le type forêt, le type savane, et le type kilifi (Sidibé, 1997). Il a été montré qu'il existe une grande diversité au sein de ces différentes souches et, que les souches de *T. congolense* différaient par leur virulence que ce soit entre les 3 types énoncés précédemment ou au sein du type savane (Van den Bossche et al., 2011). En effet, les auteurs ont observé, à la suite d'une étude comparative entre 62 souches de *T. congolense* appartenant au type Savane, que la virulence différait grandement d'une souche à l'autre.

En laboratoire, les mêmes souches de *T. congolense* sont souvent utilisées, notamment la souche IL1180 (clone de la souche STIB212, isolée pour la première fois en 1971 sur un lion en Tanzanie (Parc du Serengeti) (Geigy and Kauffmann, 1971) et la souche IL3000.

Dans la suite de ce travail, je me focaliserai sur les trypanosomes africains responsables de la TAA.

1.2.2 Cycle de développement

La reproduction chez les trypanosomes s'effectue généralement par scissiparité (division asexuée ou binaire). Des études ont cependant montré que les trypanosomes étaient également capables de se reproduire de manière sexuée, permettant ainsi l'échange de matériel génétique, comme c'est le cas pour *T. brucei* (Gibson et al., 2008), ou *T. congolense* (Morrison et al., 2009). Ces évènements semblent cependant être rares et beaucoup de mécanismes sont encore inconnus.

L'échange génétique serait particulièrement important dans l'évolution chez les parasites car il permet la dissémination, entre les souches, de gènes impliqués dans des caractères cruciaux tels que la virulence.

Le parasite effectue un cycle de développement complexe au sein du vecteur et subit alors des changements morphologiques importants (voir Figure 7) et des modifications de sa structure et composition membranaire. Les formes sanguines prolifèrent dans le sang de l'hôte infecté et sont ingérées par la glossine au cours du repas sanguin. Ainsi, pour *T. congolense*, les formes dites procycliques se différencient dans l'intestin moyen du vecteur (à l'exception de *T. vivax* (Jackson et al., 2015)). Dans le proventricule, les formes procycliques cessent leur division et deviennent uniformes en taille et en forme. Ces nouvelles formes trypomastigotes migrent ensuite vers la trompe (partie de la bouche) où elles évolueront en forme épimastigote pour enfin se différencier en forme métacyclique infectante. Ces dernières sont très petites et ne se divisent pas. Elles seront à leur tour transmises à un nouvel hôte lors d'un prochain repas sanguin puis migreront par voie lymphatique jusqu'à la circulation sanguine ((Coustou et al., 2010), (Peacock et al., 2012)).

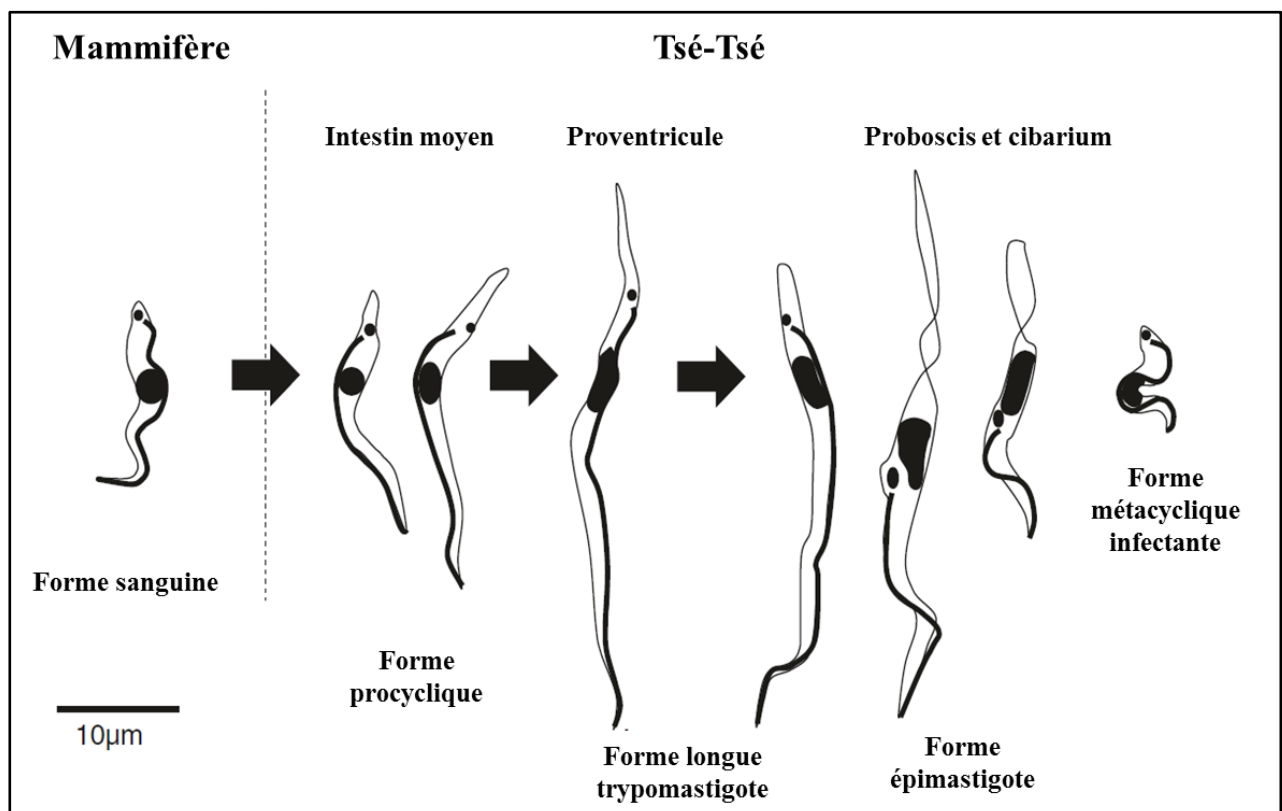


Figure 7 : Cycles évolutifs de *Trypanosoma congolense* (adapté de (Peacock et al., 2012))

1.2.3 Variabilité antigénique

En tant que parasite extracellulaire, le trypanosome est constamment soumis aux attaques du système immunitaire de l'hôte qu'il infecte. Il a donc développé des stratégies lui permettant d'échapper à cette réponse immunitaire.

Les trypanosomes possèdent deux groupes d'antigènes provoquant une réaction immunitaire chez l'hôte vertébré : des antigènes variants ou VAT (Variant Antigen Type) qui sont portés par les VSG (*Variant Surface Glycoprotein*), et les antigènes invariants.

La VSG est une glycoprotéine ancrée au niveau de la surface membranaire du parasite grâce à un groupement Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI). Cette glycoprotéine est le composant de surface majeur du trypanosome. L'ensemble de ces protéines (10^7 molécules) forme un manteau dense recouvrant la totalité du corps cellulaire, y compris le flagelle (Pays and Berberof, 1995). Le manteau de VSG se rencontre uniquement chez les formes infectantes pour l'hôte vertébré (formes métacycliques ou sanguines). Il est perdu au cours de la différenciation qui se produit chez le vecteur (absent sur les formes procycliques) et sera réacquis lorsque se produit la maturation des formes épimastigotes en formes métacycliques ((Boulangé, 1995), (Itard and Frézil, 2003)). Une VSG possède la double propriété d'être à la fois très immunogène et très variable, ce qui déroute continuellement la réponse immune (Pays, 1990) ; en ce sens, elle est le siège de la variation antigénique chez les trypanosomes. Chez l'hôte mammifère, le système immunitaire induit, lors d'une infection, la production d'anticorps permettant ainsi d'éliminer la majeure partie des trypanosomes (voir Figure 8). La parasitémie diminue, aboutissant à une phase de rémission au cours de laquelle la détection du parasite est difficile. Cependant, grâce à son répertoire de plus de 1 000 gènes différents codant pour les VSG ((Van der Ploeg et al., 1982), (Van der Ploeg et al., 1992)), le parasite va pouvoir, spontanément, changer ses glycoprotéines membranaires afin de contrecarrer les vagues d'anticorps successives produites à son encontre. En schématisant, une partie mineure de la population parasitaire qui exprime un autre type de VSG portant un VAT différent se multiplie, créant ainsi une colonie nouvelle, antigéniquement différente de la première et hors de portée de la première vague d'anticorps ((Van der Ploeg et al., 1992), (Borst and Rudenko, 1994), (Horn, 2014)). La nouvelle population de trypanosomes, ayant échappé à la neutralisation par les anticorps et exprimant des nouvelles VSG va alors pouvoir croître et persister dans l'organisme donnant lieu à une recrudescence de la parasitémie et à la synthèse de nouveaux anticorps. Plusieurs phases identiques peuvent se succéder provoquant alors un épuisement de la réponse humorale de l'hôte. Cette succession des VATs assure au parasite une longue survie chez son hôte et de grandes chances d'être transmis par la glossine (Boulangé, 1995). Une étude récente a montré la complexité de la dynamique

d'expression des VSG, soulignant que plusieurs populations parasitaires portant différentes VSG coexistent et se succèdent (Mugnier et al., 2015).

Les antigènes invariants ou « communs » sont partagés par toutes les souches d'une même espèce et parfois par toutes les espèces de trypanosomes. Ces antigènes sont constitués par des protéines de structure (protéines du cytosquelette, protéines membranaires) ou des molécules impliquées dans le métabolisme du parasite (récepteurs, transporteurs, enzymes) (Authié et al., 1993b). Certains de ces antigènes ne sont pas directement visibles au niveau de la surface du parasite, à l'inverse des VSG, et ne seront exposés au système immunitaire que lors de la lyse du parasite et induiront alors une réponse anticorps. D'autres sont excrétés/secrétés par le parasite et interagissent avec l'hôte ((Holzmüller et al., 2008), (Geiger et al., 2010)). Ces antigènes invariants, tout comme les VSG solubles, sont utilisés pour le diagnostic sérologique (Boulangé et al., 2017).

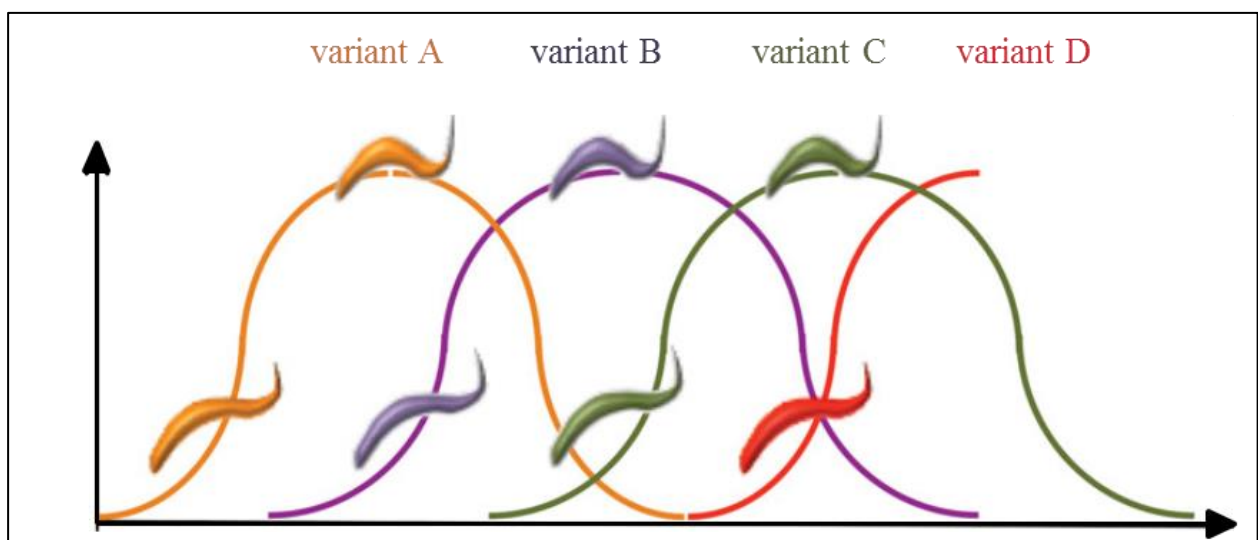


Figure 8 : Schéma simplifié de la variation antigénique classique chez les trypanosomes dans le sang des mammifères au cours des différentes vagues parasitiques pendant l'infection (adaptée de (Matthews et al., 2015)).

Les différentes couleurs symbolisent l'apparition de clones exhibant des VSG différentes sur leur membrane.

La grande diversité des souches, ainsi que la complexité du répertoire antigénique du parasite traduit par des variations continues voire presque illimitées des VSG, interdisent pratiquement, selon Pays, tout espoir de vaccination dirigée contre ces parasites (Pays and Berberof, 1995). Des études ont montré que des bovins immunisés, avec des trypanosomes irradiés ou des VSG purifiées, sont bien protégés contre une réinfection par une souche de trypanosome homologue (trypanosomes exprimant le même répertoire antigénique) mais pas contre une souche hétérologue (Wellde et al., 1974).

1.3 Les vecteurs

1.3.1 Taxonomie et distribution

Les glossines sont des insectes diptères hématophages de la famille des *Glossinidae* et du genre unique *Glossina*. Le genre *Glossina* est divisé en trois groupes : *fusca* (sous genre *Austenina*), *palpalis* (sous genre *Nemorhina*) et *morsitans* (sous genre *Glossina*). Les glossines sont présentes exclusivement en Afrique subsaharienne (voir Figure 9). Le genre *Glossina* est limité au continent africain mais deux espèces : *Glossina morsitans submorsitans* et *Glossina fuscipes fuscipes* auraient été ponctuellement répertoriées dans le sud-ouest de l'Arabie Saoudite (Elsen et al., 1990). Ces trois groupes sont retrouvés dans des zones géographiques et écologiques différentes, dans des zones de forêts pour le groupe *fusca*, des zones ripicoles humides bordant les rivières pour le groupe *palpalis*, et dans des zones de savanes pour le groupe *morsitans*. Elles sont limitées dans leur distribution géographique, car des températures trop hautes au nord ou trop basses au sud de l'Afrique, mais également un déficit hygrométrique important empêchent leur survie (Solano, 1998). Chacune des 31 espèces ou sous-espèces répertoriées possède ainsi ses propres exigences écologiques définissant alors leur habitat, leur distribution et leur abondance ((Itard, 1986), (Moloo, 2011), (Vreysen et al., 2012)).

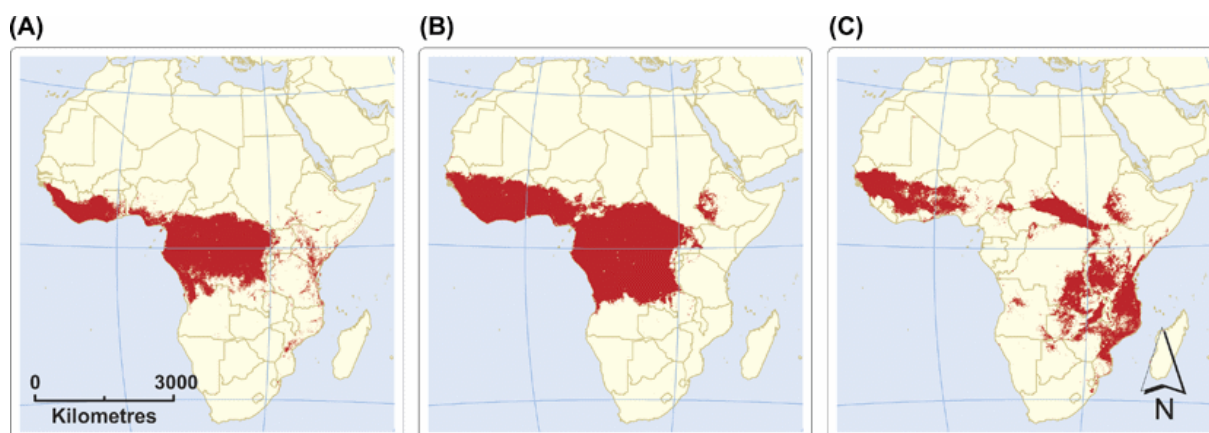


Figure 9 : Aire de répartition des glossines sur le continent africain.

A : groupe *fusca*, B : groupe *palpalis*, C : groupe *morsitans*. Figure issue de l'article de (Cecchi et al., 2008) (Doi: 10.1111/j.1365-2915.2008.00747.x)

1.3.2 Écologie

Chez toutes les espèces du genre *Glossina*, les deux sexes sont hématophages, et donc vecteurs potentiels de trypanosomes, contrairement à beaucoup d'autres insectes vecteurs, moustiques et phlébotomes par exemple, chez lesquels seule la femelle est hématophage (Solano et al., 2017). Les glossines se caractérisent par leur mode de reproduction particulier, appelé viviparité adénotrophique. Une fois la fécondation réalisée, la larve se développe dans l'utérus de

la femelle gravide, qui la nourrit grâce à des sécrétions composées de protéines et de lipides (Solano et al., 2017). La glossine s'infecte en se nourrissant sur un hôte parasité et une fois infectée, reste infectante durant toute sa vie. On considère généralement que, dans la nature, les femelles ne s'accouplent qu'une seule fois. Toutefois, des cas de polyandries ont été enregistrés dans des populations sauvages de *Glossina fuscipes fuscipes* (Bonomi et al., 2011). Cette particularité a une incidence majeure sur les moyens de lutte anti-vectorielle mis en place. De plus, l'absence d'œufs et la présence d'un stade larvaire libre dans la nature dont le développement des pupes se déroule dans le sol font du stade adulte le seul stade facilement accessible pour le contrôle (Vreysen et al., 2012).

Les trypanosomes appartenant au groupe *Salivaria* sont transmis cycliquement par des insectes du genre *Glossina* (Cuisance et al., 2003a). Le parasite effectue un cycle de développement indispensable à l'intérieur du vecteur et on parle alors de vecteur biologique (glossine) par opposition au vecteur mécanique qui, par analogie, pourrait être comparé à une seringue (tabanides et stomoxes) (Desquesnes and Dia, 2004).

Parmi les 31 espèces ou sous-espèces répertoriées, seules 8 à 10 espèces de glossines sont considérées comme ayant une importance économique (agriculture-vétérinaire) ou sanitaire car responsables de la majorité de la transmission aux hommes et aux animaux. C'est notamment le cas des espèces de groupe *palpalis* : *Glossina tachinoides*, *G. palpalis palpalis*, *G. palpalis gambiensis*, *G. fuscipes* et *G. fuscipes quanzensis*, vecteurs importants de la TAA en Afrique de l'ouest et de la THA en Afrique centrale. En Afrique orientale et australe, les principaux vecteurs de la TAA et de la THA sont *G. morsitans spp* et *G. pallidipes* qui sont les espèces les plus importantes du groupe *Morsitans* (Vreysen et al., 2012).

1.4 Diagnostic et lutte intégrée

1.4.1 Diagnostic

Il est difficile d'établir un diagnostic fiable de la trypanosomose animale en raison du manque de signes cliniques spécifiques de la maladie (Authié et al., 1999). En effet, lorsqu'un symptôme est spécifique d'une maladie (on parle alors de symptôme pathognomonique), il permet à lui seul d'établir un diagnostic précis. La fièvre, l'anémie ou encore l'affaiblissement de l'animal sont autant de symptômes pouvant être associés à d'autres maladies telles que les maladies dues aux parasites transmis par les tiques ou certaines verminoses et ne sont, par conséquent, pas assez discriminants. Néanmoins, dans les régions d'endémie, un animal amaigri et anémié est très souvent suspecté d'être porteur de trypanosomes (Boulangé, 1995).

Il existe plusieurs méthodes permettant de confirmer ou d'infirmer un premier diagnostic clinique : les méthodes directes qui consistent à visualiser les trypanosomes dans le sang (microscopique, parasitologique) ou les méthodes indirectes (séro-immunologiques et moléculaires). Plusieurs variantes de ces méthodes peuvent exister, aussi, dans un souci de clarté, je n'évoquerai ici que les méthodes les plus utilisées.

1.4.1.1 Les méthodes directes

Ces méthodes reposent sur la détection des parasites directement dans le sang de l'hôte infecté. En phase aiguë de trypanosomose, les parasites, relativement nombreux, sont détectables dans le sang périphérique.

L'examen microscopique à l'état frais, entre lame et lamelle, reste la méthode la plus simple à mettre en place. Les trypanosomes sont reconnus par leur morphologie spécifique et leur mouvement parmi les globules rouges (Desquesnes, 2017). Un frottis sanguin **coloré avec du Giemsa** peut également être réalisé et permettra de distinguer le sous-genre de trypanosomes (*Duttonella*, *Nannomonas* et *Trypanozoon*). Cependant, ces techniques, bien que très spécifiques, ne sont pas assez sensibles pour détecter de faibles niveaux de parasitémie, tel que cela peut être le cas lors d'infections chroniques (Nantulya, 1990). La limite de détection est généralement d'environ 10^4 trypanosomes par ml de sang et elle n'est donc optimale que dans le cas de fortes parasitémies (Uilenberg and Boyt, 1998).

Dans le cas de faibles parasitémies, l'examen microscopique peut également être réalisé après la centrifugation d'un tube capillaire rempli de sang (voir Figure 10). Cette technique offre une sensibilité de détection accrue et permet de connaître la valeur de l'hématocrite qui est un indicateur de l'anémie. L'hématocrite correspond au taux de globules rouges sur le volume de sang total. La valeur de 24 % est usuellement retenue, chez les bovins, pour suspecter une anémie due aux trypanosomoses en zone d'endémie ((Bellier and Cordonnier, 2010), (Desquesnes, 2017)).

Deux types de tests sont proposés :

- Le test de Woo (Woo, 1970) : Les parasites, concentrés à l'interface entre le plasma et les globules rouges au niveau de la fraction leucocytaire (ou buffy-coat), sont observés directement au microscope à travers le tube capillaire (sensibilité 10.2-10.3 trypan/ml).
- Le test de Murray (Murray et al., 1977) : C'est une variante du test précédent. Le tube capillaire est sectionné au niveau de la fraction leucocytaire, cette dernière est déposée entre lame et lamelle et les parasites sont alors observés au microscope.

L'avantage de ces techniques réside dans leur utilisation rapide et la relative facilité de mise en œuvre sur le terrain pour peu qu'une centrifugeuse et un microscope soient disponibles.

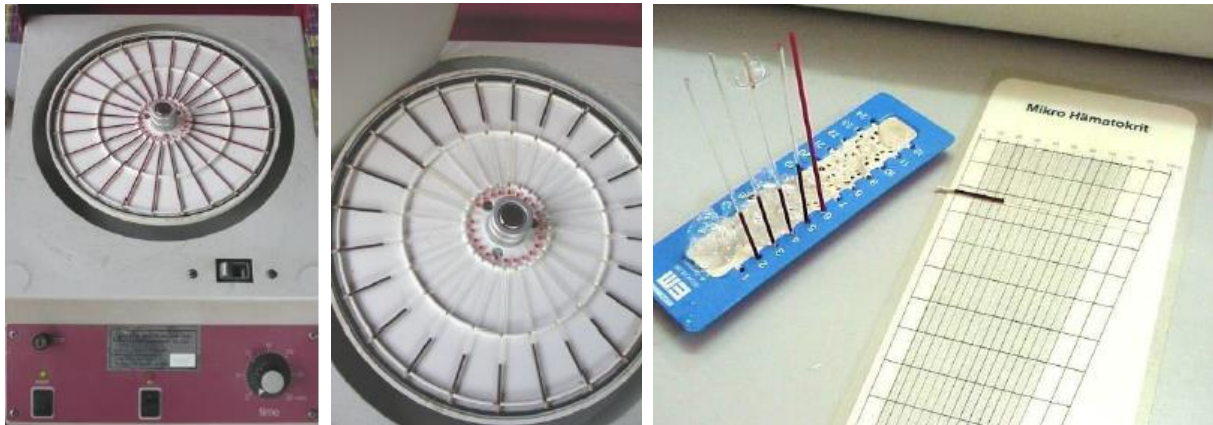


Figure 10 : Micro-centrifugeuse à capillaire et lecture de l'hématocrite sur un abaque spécifique (Desquesnes, 2017)

1.4.1.2 Les méthodes indirectes

Les tests de diagnostic sérologique sont utilisés pour dépister les infections dues aux trypanosomes et permettent de mettre en évidence la présence d'anticorps spécifiques dirigés contre les antigènes des trypanosomes (ELISA Indirect) ou la présence d'antigènes de trypanosomes (Immuno-Capture). Ces tests sont plus sensibles que les tests parasitologiques.

Parmi ces techniques sérologiques, l'**ELISA** (Enzyme-Linked Immunosorbent Assays) (Luckins and Mehlitz, 1978), est largement utilisée. Plusieurs variantes existent comme l'ELISA dit d'immunocapture ou **antigène-ELISA** (Ag-ELISA) qui vise à rechercher les antigènes circulants du parasite ; cette technique présente l'avantage de détecter des infections actives (Nantulya, 1990). Néanmoins, elle nécessite de disposer d'anticorps dirigés contre des antigènes suffisamment immuno-antigéniques et spécifiques et elle n'a jamais été utilisée sur le terrain, par manque de sensibilité.

Plus largement utilisée et diagnostic de choix des enquêtes épidémiologiques, la technique **ELISA indirect** permet de détecter les anticorps circulant en utilisant comme antigènes soit des préparations de lysats de trypanosomes (peu spécifique) soit des antigènes recombinants (plus spécifiques, mais considérés comme moins sensibles) (Boulangé et al., 2017). Contrairement à l'immunocapture, l'ELISA indirect ne permet pas de détecter des infections actives car les anticorps dirigés contre des antigènes de trypanosomes peuvent persister pendant plusieurs mois après traitement de l'animal ou sa guérison spontanée ((Bocquentin and Duvallet, 1990), (Boulangé, 1995)). Un animal positif au test sera donc considéré comme ayant des anticorps anti trypanosomes sans qu'il soit pour autant possible d'affirmer que l'infection est en cours ou

passée. De plus, la présence de réactions croisées dues à des co-infections (espèces différentes ou souches différentes) rend difficile le diagnostic d'espèces avec cette technique. L'ELISA indirect ne fournira donc qu'un diagnostic de présomption (Lejon, en préparation). Un test de diagnostic rapide (TDR) (VeryDiag, Ceva[®]) a vu le jour ces dernières années et permet la détection spécifique de deux espèces de trypanosomes (*T. congolense* et *T. vivax*). Basé sur les principes de l'ELISA et utilisant des antigènes recombinants (donc plus purs), ce test permet ainsi aux acteurs de terrain de mener un diagnostic rapide de la maladie en s'affranchissant des contraintes techniques, d'infrastructures et d'équipements (Boulangé et al., 2017). Cependant, ce test, qui est commercialisé mais dont les performances doivent être mieux déterminées sur le terrain, reste encore trop onéreux pour la plupart des éleveurs, et il est fort probable que son utilisation soit, de fait, limitée.

La méthode d'**immunofluorescence indirecte (IFI)** (Katende et al., 1987) initialement utilisée chez l'homme puis chez l'animal permet notamment la détection de *T. vivax*. Cette technique permet de détecter les immunoglobulines produites. Le sérum Katende de l'individu infecté est incubé en présence des parasites préalablement fixés à l'acétone sur une lame (frottis à partir de sang à forte parasitémie ou à partir d'une suspension de trypanosomes). Des anticorps conjugués à la fluorescéine et dirigés contre les immunoglobulines de l'espèce hôte testée sont ajoutés permettant ainsi la détection des trypanosomes en lumière ultraviolette (coloration verte/jaune des parasites) (Desquesnes et al., 2003). La sensibilité de cette méthode même si peu spécifique (réactions croisées) reste satisfaisante.

Les méthodes de diagnostic moléculaire font appel au principe d'amplification en chaîne par polymérase ou PCR (Polymerase Chain Reaction). La technique PCR a permis de considérablement améliorer la sensibilité du diagnostic des trypanosomoses (Desquesnes, 1997). À la différence des techniques indirectes qui peuvent rester positives plusieurs mois, voire années, après le traitement (persistance des anticorps ou des antigènes dans le sang), la PCR permet de mettre en évidence une infection active de façon beaucoup plus sûre que l'immunocapture puisque la persistance de l'ADN de trypanosomes morts dans le sang n'excède pas un à deux jours (Jamonneau et al., 2004).

Cette technique, très sensible, permet de diagnostiquer des infections à trypanosomes aussi bien chez l'hôte mammifère (homme ou animal) que chez le vecteur (glossine).

Ces méthodes requièrent néanmoins un équipement sophistiqué relativement coûteux ainsi que des compétences techniques non négligeables, ce qui rend leurs utilisations difficiles dans certains laboratoires de pays endémiques. Le diagnostic de choix pour confirmer un cas clinique

demeure l'observation directe des trypanosomes au microscope, dont la spécificité est parfaite mais la sensibilité malheureusement faible. La PCR et l'ELISA indirect sont utilisés pour la recherche et l'épidémiologie (www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/3.04.16_TRYPANOSOMOSIS.pdf).

En conclusion, dans l'attente de la validation du TDR et de son appropriation par des acteurs du terrain (vétérinaires, services de l'élevage, éleveurs), les éleveurs doivent faire appel à des laboratoires spécialisés, possédant *a minima* une centrifugeuse et un microscope, pour faire effectuer un diagnostic de trypanosomose. Dans ces conditions, un diagnostic n'est que rarement réalisé et les éleveurs traitent leurs animaux avec des trypanocides, sans confirmation de la présence de trypanosomes.

1.4.2 La lutte intégrée

La lutte contre les TAA est un enjeu majeur pour le développement de l'élevage et de l'agriculture en Afrique sub-saharienne. En absence de vaccin, il existe actuellement trois grandes stratégies mises en œuvre afin de lutter efficacement contre les trypanosomoses (Cuisance et al., 2003b). La première repose sur la lutte anti vectorielle permettant ainsi de bloquer la transmission des parasites via leurs vecteurs. La seconde consiste à traiter les animaux à l'aide de molécules trypanocides. Enfin, la troisième stratégie réside dans l'utilisation et la promotion de races locales trypanotolérantes qui sont naturellement capables de tolérer le parasite et les effets délétères associés. L'intégration de la lutte anti-vectorielle et de l'utilisation des trypanocides est nécessaire pour réduire la TAA, la morbidité et la mortalité des bovins et pour réduire l'incidence des souches de trypanosomes résistantes aux médicaments (Bouyer et al., 2013).

1.4.2.1 Lutte contre le vecteur

L'éradication des glossines est impossible dans de nombreuses régions d'Afrique compte tenu des conditions environnementales, politiques et économiques (Bouyer et al., 2013). Différentes stratégies sont mises en œuvre et sont adaptées à un contexte environnemental en perpétuelle mutation. En effet, les espèces de glossines en cause, leur habitat, leur répartition ainsi que les pratiques d'élevage peuvent être différentes d'une région à une autre et auront un impact important sur les moyens de lutte utilisés.

Le contrôle du vecteur a pour objectif de réduire voire rompre le cycle de transmission des parasites. Cette lutte peut se faire à l'échelle locale, individuelle ou du troupeau, en appliquant

des traitements insecticides directement sur les animaux (Torr et al., 2007) ou bien en utilisant des pièges de type écrans imprégnés ou, à une échelle régionale, par le lâcher de mâles stériles (SIT) ou l'épandage aérien d'insecticides.

Les premières méthodes de contrôle consistaient à détruire l'habitat des glossines en pratiquant notamment le défrichage (ou déboisement) et en abattant la faune sauvage présente dans les zones d'intérêt. Néanmoins, bien que très efficaces, ces méthodes sont devenues inacceptables pour des raisons environnementales.

L'utilisation de la lutte chimique, par la pulvérisation d'insecticides (tels que le DTT ou encore l'endosulfan), par voie terrestre ou aérienne, au niveau d'habitats connus pour abriter les glossines a permis de réduire considérablement certaines populations de mouches. Toutefois, bien que l'épandage se soit avéré comme étant très efficace et adapté au traitement de zones relativement vastes, son impact négatif sur d'autres espèces non cibles et sur l'environnement limite de fait son utilisation. De plus, cette tactique de contrôle nécessite une main-d'œuvre importante, des compétences techniques et représente un coût relativement élevé. Il faut également souligner que des problèmes de réinvasions de la zone assainie subsistent et que, de ce fait, l'éradication absolue sur des zones étendues n'est pas envisageable (Cuisance et al., 2003b). Une réduction durable des populations de glossines permettant ainsi de réduire l'incidence de la maladie à un niveau localement acceptable constitue probablement un objectif plus réaliste.

Dans ce sens, l'utilisation de la lutte mécanique par piégeage constitue une alternative intéressante et plus respectueuse de l'environnement. Cette méthode s'avère efficace mais nécessite, tout comme les autres méthodes, de bien connaître l'écologie des glossines, leur répartition et leur densité apparente (Bouyer et al., 2006). Le piégeage est effectué par l'intermédiaire de pièges tels que le piège biconique de Challier-Laveissière (Challier and Laveissière, 1973) ou encore le piège monoconique Vavoua (Laveissière and Grébaut, 1990) soit par l'intermédiaire d'écrans de couleur bleue, teinte attractive pour la glossine, imprégnés d'attractants olfactifs et d'insecticides rémanents (généralement à base de pyréthrinoïdes) ((Laveissière et al., 1981), (Green, 1986), (Green, 1988)).

Le piégeage représente ainsi une méthode de lutte réellement efficace dont le pouvoir de réduction des populations de vecteur à très court terme peut être comparé aux pulvérisations d'insecticides. A l'inverse de cette dernière technique, outre son innocuité pour la faune terrestre et aquatique, le piégeage présente un atout majeur relatif à son faible prix de revient (Laveissière et al., 1981).

Enfin, la lutte génétique est une technique présentant de nombreux avantages puisqu'elle est très spécifique, non polluante et ne présente aucun danger pour les autres espèces animales. Cette technique est basée sur l'introduction, dans la population naturelle de glossines, de mâles préalablement stérilisés en laboratoire (par radiation aux rayons gamma ou chimiquement provoquant alors des lésions des chromosomes des gamètes). Les mâles sont lâchés par voie aérienne ou terrestre en très grande quantité et vont ainsi entrer en compétition pour l'accouplement avec leurs homologues sauvages fertiles ((Cuisance and Itard, 1973), (Cuisance et al., 1978)). Les femelles glossines ne s'accouplent généralement qu'une seule fois au cours de leur vie, l'accouplement avec les mâles stériles ne produira aucune descendance et permettra ainsi de diminuer les populations de glossines. Cette méthode est applicable sur des zones bien isolées et en association avec d'autres méthodes (pièges, écrans, pulvérisations de produits non rémanents) pour faire baisser les densités de glossines avant les lâchers (Bouyer et al., 2013).

Une méthode, qui est en cours d'évaluation, a pour principe de combiner les deux approches décrites précédemment, la contamination de mâles stériles avec du pyriproxypène, un biocide, analogue de l'hormone juvénile, qui permet de bloquer le développement du stade pupal de la glossine et de diminuer, de fait, la fécondité de la femelle ((Sullivan and Goh, 2008), (Langley et al., 1990)). Cette approche aurait un effet double : les mâles stériles vont pouvoir stériliser les femelles sauvages vierges mais également les femelles déjà fécondées lors de tentatives d'accouplements ((Laroche, 2018), <https://revolinc.cirad.fr/>).

Toutes ces approches présentent des avantages et des inconvénients et ne sont pas applicables dans toutes les situations. En effet, de nombreux paramètres sont à prendre en considération tels que les populations de glossines (effectif, capacité de migration entre sites, espèce), leur zone de répartition, les conditions bioclimatiques locales ou encore le niveau de participation ou d'appropriation des populations locales, les compétences techniques disponibles, ainsi que le coût de la lutte et son financement, dans la durée, par des bailleurs de fonds ou les Etats ((Bouyer et al., 2011), (Meyer et al., 2016)). Aucune méthode n'est donc capable d'offrir, à elle seule, une garantie de réussite totale dans un laps de temps relativement court, sans incidence sur l'environnement et à des coûts acceptables (Cuisance et al., 2003b). Il apparaît donc qu'une approche dite de lutte intégrée, regroupant un ensemble de méthodes et techniques de lutte, est souhaitable pour permettre ainsi de satisfaire aux exigences économiques, environnementales et d'incidences toxicologiques tout en assurant un meilleur impact sur la réduction des populations de glossines (Berthier, 2009). Le cas de l'éradication des glossines dans la région des Niayes, au Sénégal, démontre qu'il est en tout cas possible d'éradiquer une population de glossines à l'aide

d'un ensemble de techniques de lutte (pièges, traitement de bovins et lâcher de mâles stériles), à condition que la population de glossines soit isolée des autres (Solano et al., 2010) et que l'effort de lutte soit soutenu et continu, et supporté par une forte expertise scientifique (<https://www.cirad.fr/actualites/toutes-les-actualites/articles/2018/evenements/senegal-eradication-mouches-tse-tse-dope-l-elevage>).

1.4.2.2 Lutte par traitements trypanocides

La lutte contre les parasites repose sur l'utilisation de traitements trypanocides curatifs, lorsque l'animal est infecté, ou préventifs permettant ainsi aux animaux soumis à une forte pression parasitaire d'être protégés vis-à-vis de l'infection. L'utilisation curative et prophylactique de médicaments trypanocides, généralement administrés par les agriculteurs eux-mêmes, reste la méthode la plus importante de lutte contre la TAA en Afrique. L'effet du traitement trypanocide sur les bovins infectés dépend de l'état de l'infection. En effet, durant la phase précoce de la maladie, le traitement entraîne habituellement une récupération clinique et hématologique rapide. En revanche, au cours des phases chroniques de longue date, la récupération clinique peut être très lente même si l'élimination des parasites est effective.

Il existe actuellement deux traitements utilisés contre la nagana. Ces différents usages sont guidés par la différence de demi-vie des différentes molécules. L'acéturate de diminazène (BERENIL®) ainsi que le chlorure d'isométhamidium (SAMORIN®, TRYPANIDIUM®) sont les plus utilisés en Afrique de l'Ouest. Le chlorure d'isométhamidium est principalement utilisé en tant que traitement prophylactique et permet alors une protection de l'animal pouvant aller jusqu'à deux mois. A l'inverse, l'acéturate de diminazène est utilisé pour ses propriétés thérapeutiques lors d'une infection en cours (Maudlin et al., 2004).

On estime actuellement qu'environ 35 millions de doses de ces médicaments sont utilisées en Afrique chaque année et qu'environ 50 millions de bovins seraient soumis au risque trypanosomien. Malgré une demande constante des éleveurs, pour ces traitements trypanocides, qui s'élève à environ 30 millions de dollars (Cuisance et al., 2003b), aucune nouvelle molécule n'a été développée depuis ces 40 dernières années. En effet, les grandes compagnies pharmaceutiques ne souhaitent pas investir dans le développement d'un nouveau composé qui nécessiterait des investissements jugés assez peu rentables.

De plus, l'apparition sur le marché de contrefaçons ajoutée à une mauvaise utilisation des traitements (sous-dosage, notamment) ainsi qu'à des difficultés d'approvisionnements en médicaments de qualité, ont engendré l'apparition de souches de trypanosomes de plus en plus

résistantes ((Peregrine et al., 1991), (Geerts et al., 2001), (Delespaulx et al., 2008), (Tchamdja et al., 2016), (Bengaly et al., 2018)).

Dans le cadre d'une approche intégrée de la lutte, les techniques de lutte anti-vectorielle et l'utilisation de médicaments trypanocides peuvent être combinées. L'utilisation des traitements trypanocides est d'autant plus importante que les bovins sont sensibles, que le système d'élevage est extensif avec un fort contact bovin*vecteur aux points d'abreuvement des troupeaux et en bordure de forêt ou de savane ((Van den Bossche, 2001), (Dayo et al., 2010), (Bouyer et al., 2013)).

1.4.2.3 L'usage des races trypanotolérantes

Dans des zones endémiques, où la lutte contre les glossines et l'utilisation de trypanocides devraient être permanentes et donc extrêmement coûteuses, l'élevage de races, dites trypanotolérantes, demeure la seule solution durable et bien adaptée à des systèmes d'élevage à faible niveau d'intrants (Bouyer et al., 2013). La trypanotolérance fait l'objet du chapitre 2.

1.5 Hôte bovin

1.5.1 Définition de la trypanotolérance

Comme j'ai pu l'écrire dans les paragraphes précédents, il existe des degrés variables de tolérance à l'infection par les trypanosomes chez les animaux et particulièrement chez les bovins. Cette tolérance porte le nom de trypanotolérance et est définie comme la capacité que possèdent certaines races taurines d'Afrique de l'Ouest à tolérer la maladie : elles contrôlent la multiplication des trypanosomes et les effets pathogènes associés (anémie, perte de poids) et restent productives dans les zones d'enzootie ((Murray et al., 1979), (Murray et al., 1982), (Murray et al., 1984)). A l'inverse, les zébus et les races taurines européennes meurent généralement de l'infection en l'absence de traitement. Cette capacité est également présente chez d'autres espèces de mammifères notamment au niveau de la faune sauvage, comme les buffles (Black et al., 2001) et les antilopes, mais serait également présente chez les petits ruminants comme le mouton Djallonké ou encore la chèvre naine d'Afrique de l'ouest ((Osaer et al., 1994), (Geerts et al., 2009)).

La différence de susceptibilité/tolérance aux trypanosomoses observée entre les races bovines trouve probablement son origine dans leur histoire évolutive et, la trypanotolérance est sans doute la conséquence de l'effet de la pression de sélection exercée par les parasites et leurs vecteurs sur les premières populations bovines qui ont colonisé les zones d'enzootie de la

maladie. Une approche prometteuse de la lutte contre la maladie consiste donc à comprendre et à exploiter cette trypanotolérance naturelle chez certaines races bovines.

1.5.2 Histoire des races bovines

Des études archéologiques ((Allchin, 1969), (Grigson, 1978), (Meadow, 1993)) et moléculaires ((Bradley et al., 1996), (Loftus et al., 1994), (MacHugh et al., 1997)) ont permis de démontrer que les deux principaux groupes taxonomiques de bovins domestiques étaient le résultat d'évènements de domestication distincts (voir Figure 11). Historiquement, les bovins ont été domestiqués il y a environ 10 000 ans dans deux zones : le croissant fertile où ont été domestiqués les bovins de type taurin (sans bosse, *Bos taurus*) et la vallée de l'Indus (actuel Pakistan) où ont été domestiqués les animaux de type zébu (bovin à bosse, *Bos indicus*) (Loftus et al., 1994). Les différents itinéraires de migration sont représentés sur la Figure 11. Les taurins ont été les premières populations bovines introduites en Afrique, les taurins à longues cornes précédant les taurins à courtes cornes (Payne and Hodges, 1997). Ces populations seraient les descendantes des aurochs (*Bos primigenius*) ((Wendorf and Schild, 1994), (Edwards et al., 2007)) et auraient été introduites sur le continent africain via l'Égypte mais également via la région nord-orientale à partir de 6000 ans avant JC (en rouge sur la Figure 11). Elles se seraient ensuite répandues au sein du continent entre 5000 avant JC et 500 après JC (violet) et auraient donc été les premières à être confrontées à la pression de sélection exercée par les trypanosomes. Ces animaux seraient les ancêtres des races taurines actuelles d'Afrique de l'Ouest, comportant la race N'Dama, race taurine à longues cornes d'Afrique de l'Ouest, et un ensemble de races à courtes cornes. Les animaux de type zébu auraient été introduits plus tardivement sur le continent africain, à travers la Corne de l'Afrique. Les premiers seraient arrivés il y a environ 2000 ans avant JC (bleu) puis d'autres vagues auraient ensuite été identifiées 700 ans après JC (jaune) puis enfin au XIX^e siècle ((Epstein, 1971), (Loftus et al., 1994), (Bradley et al., 1996), (MacHugh et al., 1997), (Hanotte et al., 2002)). Cette dernière vague pourrait avoir eu lieu probablement à la suite des épidémies de peste bovine, qui ont anéanti la plupart des bovins africains (Mack, 1970).

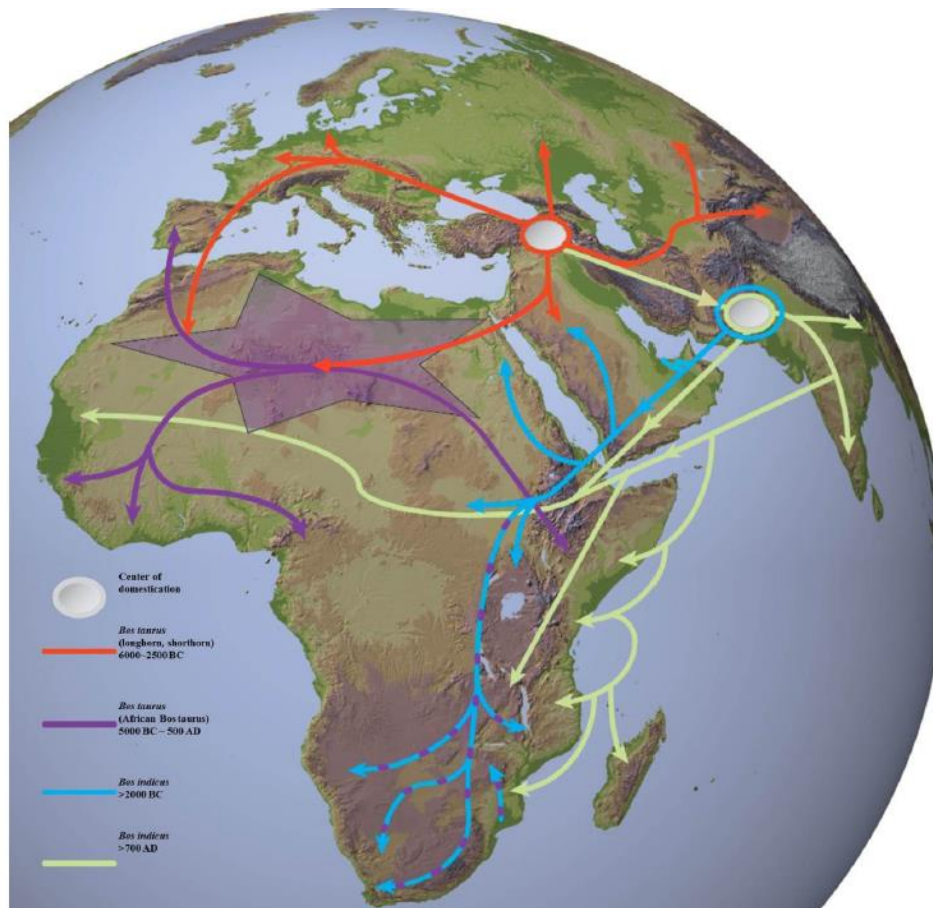


Figure 11 : Itinéraire approximatif de migration et origine du bétail domestique en Afrique (Mwai et al., 2015).

Les cercles blancs représentent les centres attendus de domestication du bétail. Les flèches représentent les différents itinéraires de migration vers le continent africain et au sein du continent africain. La couleur des flèches symbolise les dates de migration ainsi que les races. A noter qu'une potentielle introgression des taurins issus du Croissant Fertile avec des populations bovines africaines (symbolisée par l'étoile violette) est sujette à controverse.

1.5.3 Les races bovines africaines

Il existe une grande diversité de races bovines et on en recense actuellement plus de 800 races à travers le monde. Parmi elles, environ 180 races bovines sont présentes en Afrique subsaharienne (Mwai et al., 2015). Les deux principaux groupes taxonomiques de bovins domestiques rencontrés en Afrique sont les taurins « sans bosse » *Bos taurus* et les bovins de type zébus « avec bosse » *Bos indicus*. Les bovins de type zébu constituent la majorité des bovins africains (Hanotte et al., 2000) et sont morphologiquement différenciables grâce à la présence d'une bosse thoraco-cervicale. Les bovins de type taurins sont principalement présents en Afrique de l'Ouest (Mwai et al., 2015). Leurs gabarits sont beaucoup moins imposants que ceux des zébus ou des races européennes et ils sont également moins productifs en valeur absolue (viande, lait, force de traction) (Renaudeau et al., 2012). Cependant, dans des zones de

fortes pressions trypanosomiennes, la productivité des races tolérantes restent plus importante (Murray et al., 1990), puisque les zébus seront fortement amoindris, voire mourront de la maladie. Lorsqu'on observe les cartes de répartition des glossines (voir Figure 9), et celle des bovins à l'échelle du continent africain (voir Figure 12) ou de l'Afrique de l'Ouest (voir Figure 13), on constate une superposition entre la présence des glossines et des taurins (mais tout de même une absence de bétail en forêt tropicale au centre du continent), et une exclusion glossines — zébus.

Notons cependant qu'il n'existe pas de dichotomie nette entre les races taurines et les races indicines en Afrique. En effet, des croisements, plus ou moins anciens, ont eu lieu entre ces deux sous-espèces, donnant lieu à des races dites croisées ou métisses. Cela s'explique notamment par l'histoire de ces races et les nombreuses migrations humaines et animales qui ont eu lieu au cours du temps. On retrouve ces groupes intermédiaires sur presque tout le continent africain (Mwai et al., 2015). Des études génomiques ont ainsi démontré que ces races bovines partageaient, à des degrés différents, des portions de génome d'origine taurine et zébu, et les races dites zébu portent de l'ADN mitochondrial d'origine taurine (MacHugh et al., 1997). Les animaux d'Afrique de l'Ouest ont majoritairement un génome autosomal de type taurin, alors que les animaux d'Afrique de l'Est ont essentiellement un génome autosomal de type zébu. Il n'existe ainsi pas de races pures zébus « *Bos indicus* » sur le continent africain ((MacHugh et al., 1997), (Mwai et al., 2015)). Entre les deux, on observe des degrés de mélanges intermédiaires ((Hanotte et al., 2002), (Freeman et al., 2004), (Freeman et al., 2006)). Cependant, comme dans la littérature internationale, nous garderons le terme « zébu » pour les races africaines qui présentent une bosse cervico-thoracique bien formée, rappelant leur forte parenté avec les zébus indiens.

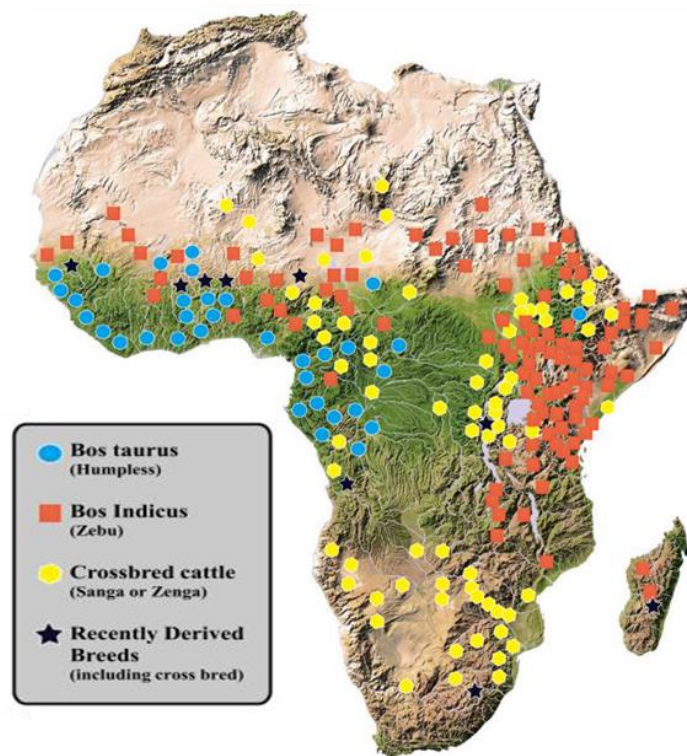


Figure 12 : Distribution des races bovines locales en Afrique subsaharienne (Mwai et al., 2015)

La Figure 12 représente la distribution du bétail en Afrique sub-saharienne et chaque symbole indique le type de bovin présent dans la région. En bleu sont représentés les taurins *Bos taurus* ; en rouge, les zébus *Bos indicus* ; en jaune et en noir, les bovins croisés (entre races taurines et zébus) plus ou moins récemment. Les bovins d'Afrique du Nord et les races bovines commerciales importées ne sont pas représentés sur cette carte.

La Figure 13 représente plus particulièrement la distribution des différents types de bovins en Afrique de l'Ouest.

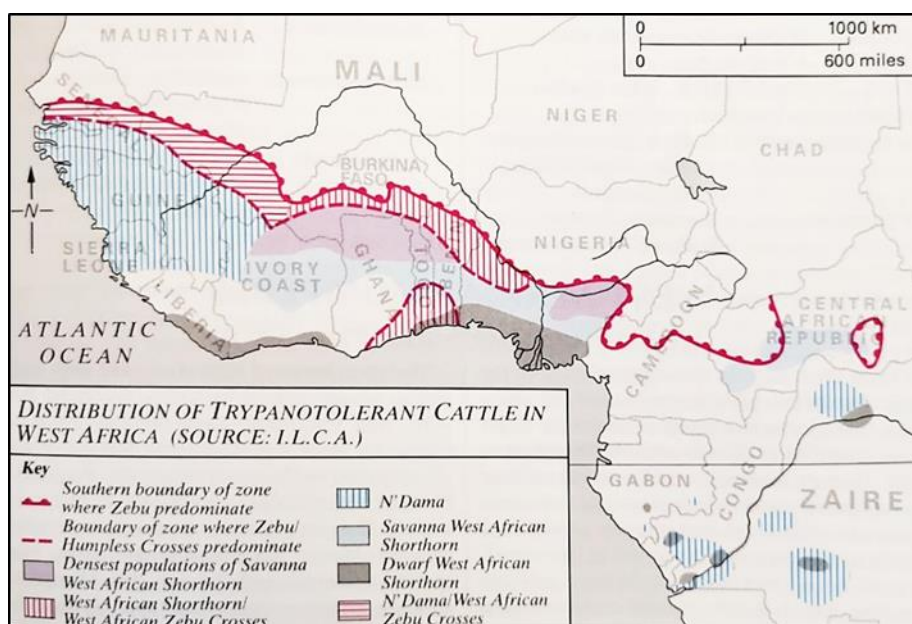


Figure 13 : Carte de répartition des bovins de type taurin, zébu et croisé en Afrique de l'Ouest (Source (Porter, 1991))

1.5.3.1 Races bovines trypanotolérantes

Bien qu'il existe des degrés variables de tolérance et de sensibilité à l'infection par les trypanosomes au sein même d'une race, les races bovines dites trypanotolérantes sont essentiellement représentées par les taurins.

On distingue, parmi ces taurins, deux grands groupes : les taurins à longues cornes et les taurins à courtes cornes. Ces bovins appartiennent généralement à des troupeaux sédentaires qui prédominent dans les zones chaudes et relativement humides et subhumides. Ils sont utilisés pour la production de viande, parfois pour la traction, et plus rarement pour la production de lait. Ils sont généralement élevés en troupeau de petite taille (5 à 20 animaux), quoique quelques troupeaux plus grands de Baoulés ou N'Dama puissent être rencontrés. Ils sont élevés en système extensif, avec peu d'intrants, autour des villages et sont souvent parqués la nuit (Rege et al., 1994b).

1.5.3.1.1 Taurins à longues cornes

Les représentants actuels des taurins à longues cornes sont les taurins N'Dama (Photo 1).

Le berceau de la race N'Dama est situé dans le massif du Fouta-Djallon en Guinée. Son aire de répartition est néanmoins beaucoup plus large couvrant ainsi la Gambie, l'ouest de la Guinée-Bissau, le sud du Sénégal et de la Sierra Leone, le nord-est du Liberia, le nord-est de la Côte d'Ivoire et le Mali ((Epstein, 1971)), (Rege and Tawah, 1999), (Dayo et al., 2009)). Cette race a également fait l'objet d'importations multiples vers de nombreux autres pays d'Afrique occidentale (Bénin, Burkina Faso, Ghana, Nigeria et Togo) et d'Afrique centrale (Cameroun,

Congo, Gabon, République Centrafricaine et République Démocratique du Congo) (Dayo et al., 2009), en particulier dans les régions infestées par les glossines. Cette race est caractérisée par des animaux de petite taille ne dépassant généralement pas 1,10 mètre au garrot et d'un poids compris entre 220 et 360 kg pour un mâle adulte (Rege, 1999). On estime actuellement que les populations de bovins N'Dama s'élèvent à plus de 6,6 millions de têtes de bétail réparties dans les pays d'Afrique de l'Ouest et d'Afrique centrale (Agyemang, 2000).



Photo 1 : Taurillon N'Dama (à gauche) (© S. Thévenon) et taureau adulte N'Dama (à droite) (© Kouato).

1.5.3.1.2 Taurins à courtes cornes

Ce groupe est essentiellement retrouvé au sud de l'Afrique de l'Ouest et en Afrique centrale. Il se subdivise en deux types, en fonction du format des bovins.

- Les types forestiers ou taurins nains

Ce type est composé de bovins de petites tailles (90 centimètres au garrot en moyenne) qu'on retrouve en zones côtières et forestières. Leur poids moyen est compris entre 180 et 280 kilogrammes pour les mâles (Rege and Tawah, 1999). Ces bovins comprennent des populations apparentées mais leur dénomination est différente selon les pays. Il s'agit des Lagunaires (Photo 2) dont l'aire de répartition couvre le Bénin, la Côte d'Ivoire, le Ghana, la République Démocratique du Congo et le Togo ; les Muturu (au Nigeria) et la race Manjaca (en Guinée Bissau). Ils sont représentés par de très petits effectifs. Les derniers chiffres datant de la fin des années 1990 indiquent qu'il y aurait environ 100 000 têtes de bétail, ce qui représenterait environ 1 % des bovins trypanotolérants (Hoste et al., 1988). Ces différentes races naines dérivent probablement du type de savane. La réduction de leur taille est probablement liée aux pressions de sélection exercées par l'environnement (forêts humides) où l'alimentation est pauvre et le climat est dur ((Hoste et al., 1988), (Dayo et al., 2009)).



Photo 2 : Taurin Lagunaire (© S. Thévenon)

- Les types de savane

Les bovins de ce type mesurent environ 90 à 110 centimètres au garrot et pèsent entre 160 et 300 kilogrammes en moyenne (Rege, 1999). Leur aire de répartition comprend les savanes guinéennes ou soudano-guinéennes depuis la Côte d'Ivoire jusqu'au Cameroun (Dayo et al., 2009). La race Baoulé est la plus représentative de ce groupe (Photo 3). Elle est éponyme de l'ethnie qui l'élève dans le centre de la Côte d'Ivoire. Son effectif, estimé dans les années 1990, fait état d'environ 600 000 à 870 000 têtes (Rege et al., 1994a).

Cependant, à ce jour, aucun recensement des différents types de populations n'est disponible et ces chiffres sont vraisemblablement très supérieurs aux effectifs actuels. Le nombre d'animaux de race pure diminue rapidement et même les plus grands bovins de type savane cèdent lentement leur place à des populations d'animaux croisés avec les zébus ((Porter, 1991), (Agyemang, 2000)).



Photo 3 : Taurin Baoulé (© M. Desquesnes)

1.5.3.2 Races bovines sensibles

En Afrique, les races trypanosensibles sont représentées essentiellement par les zébus (bovins à bosse cervico-thoracique) ((Dargie et al., 1979), (Akol et al., 1986), (Murray et al., 1990), (Paling et al., 1991)). Il existe une grande diversité de races zébus en Afrique et notamment en Afrique de l'Ouest (Peul, Azawak, Goudali, Maure, Gobra, Fulani, Bororo...) (Photo 4) et les différentes races sont généralement localisées dans des zones dépourvues de glossines principalement dans les zones sahéliennes (Rege and Tawah, 1999). Les troupeaux sont principalement transhumants ou semi-transhumants, mais une grande diversité de systèmes d'élevage existe, du pastoralisme transhumant (avec des troupeaux de 55 têtes en moyenne au Burkina Faso par exemple et des animaux utilisés principalement pour le lait) à l'agropastoralisme sédentaire avec quelques têtes et des animaux qui servent à la traction pour l'agriculture (Kone et al., 2012). Les races zébus possèdent des gabarits beaucoup plus importants que les taurins décrits précédemment. Leurs caractéristiques zootechniques (grande taille, production de lait supérieure à celle des taurins...) font de ces races un atout important auprès des éleveurs, et les zébus tendent à supplanter les taurins ou les métisses quand l'incidence des trypanosomoses chute (Bouyer et al., 2014).

Les taurins exotiques de type européen, qui font parfois l'objet d'importation en Afrique, sont également sensibles à la maladie (Murray et al., 1990).



Photo 4 : Zébu (© M. Peyllhard)

1.5.3.3 Races métisses

Les races métisses sont issues d'un croisement entre des zébus trypanosensibles et des taurins à courtes cornes trypanotolérants. Elles possèdent des phénotypes intermédiaires notamment vis-à-vis de la TAA (Murray et al., 1982). Parmi ces populations, certaines sont issues de

croisements plus ou moins stabilisés et sont considérées comme des races distinctes (Dayo et al., 2009).

On retrouve dans ce groupe la race Borgou (Photo 5), originaire du Bénin, issue d'un croisement entre les zébus Peul (white Fulani) et les taurins (Somba) (Porter, 1991). Cette race représenterait 51 % de la population bovine du Bénin et son effectif atteignait les 760 000 têtes en 2002 (Ministère de l'Agriculture, 2002). D'autres races métisses, dites groupe Sanga, sont rencontrées également au Togo, au Nigéria (race Keteku), au Sénégal (race Djakoré) ou encore au Ghana (race Sanga).



Photo 5 : Borgou (© C. Dayo)

2 Les bases biologiques de la trypanotolérance chez les bovins

Les bases biologiques de la trypanotolérance demeurent en grande partie méconnues. En tant que phénotype exprimé lors d'une maladie parasitaire, les études ont principalement porté sur la réponse immunitaire de l'hôte à l'infection par les trypanosomes, mais des mécanismes autres qu'immunologique peuvent entrer en jeu. Ainsi, de manière générale, la trypanotolérance apparaît comme un équilibre, souvent fragile, entre des facteurs immunologiques, physiologiques, en interaction avec l'environnement (Boulangé, 1995). Les principaux résultats et hypothèses de différentes études menées jusqu'ici seront présentés dans les parties suivantes.

2.1 Les mécanismes non immunologiques

2.1.1 Facteurs physiologiques

Il existe des différences physiologiques, entre les bovins trypanotolérants et trypanosensibles et ces différences proviendraient d'une adaptation accrue de certaines races taurines au milieu tropical. On observe ainsi, chez les races trypanotolérantes N'Dama, une meilleure adaptation à

un environnement humide avec une plus grande capacité de régulation de la température corporelle, une meilleure utilisation des nutriments ingérés ainsi qu'une peau plus épaisse ((Murray et al., 1982), (Murray et al., 1984)). Ces traits liés à une meilleure adaptation globale aux environnements favorables aux glossines, par rapport aux zébus qui ont de meilleures performances en zone plus aride, pourraient contribuer à la trypanotolérance.

Des différences ont également été observées, au niveau de la composition de la membrane des globules rouges, entre la race tolérante N'Dama et une race Zébu sensible du Nigéria (Igbokwe et al., 1995). Ces différences reposent sur la quantité d'acide sialique présente à la surface des hématies. Les bovins N'Dama posséderaient des quantités d'acide sialique significativement supérieures au niveau des membranes érythrocytaires comparées à celles observées chez les zébus (Esievo et al., 1986). Dans les conditions normales i.e. en l'absence de parasites, le processus naturel de sénescence conduit à une diminution du contenu en acide sialique membranaire des érythrocytes, qui entraîne l'élimination de ces derniers par les cellules phagocytaires (Labie, 2012). Or, les parasites du genre *Trypanosoma* sont capables d'hydrolyser les acides sialiques présents à la surface des hématies grâce à la sécrétion de sialidases (neuraminidase) provoquant ainsi des lésions érythrocytaires et une anémie sévère ((Coustou et al., 2012), (Guegan et al., 2013)). De ce fait, Esievo *et al.*, suggèrent que la plus grande quantité d'acide sialique présente au niveau des membranes érythrocytaires chez les bovins tolérants serait un atout pour limiter l'anémie due à l'érythrophagocytose (Esievo et al., 1986).

2.1.2 Facteurs lytiques

Des facteurs sériques ayant des propriétés trypanolytiques contre les principaux parasites infectant le bétail ont été identifiés chez l'homme. Il en va de même, chez certains animaux sauvages, tels que l'éland (*Taurotragus* sp.) et le buffle (*Syncerus caffer*) ((Black et al., 1997), (Muranjan et al., 1997)), chez lesquels il existe un facteur sérique possédant des caractéristiques similaires. Il a été mis en évidence, *in vitro*, que ce facteur sérique, identifié comme étant la xanthine oxydase, était capable de lyser, dès leur pénétration dans le derme, les formes infectieuses des parasites (*T. brucei*, *T. b. gambiense*, *T. b. rhodesiense*, *T. vivax*, *T. congolense* et *T. evansi*). Ce facteur exercerait son action trypanolytique en inhibant la glycolyse chez les trypanosomes (Muranjan et al., 1997). A l'heure actuelle, aucun facteur lytique tels que ceux retrouvés chez l'homme ou certains animaux sauvages n'a été mis en évidence chez les bovins trypanotolérants. Il semblerait, néanmoins, que chez ces animaux, une activité sérique élevée de la PolyAmine Oxydase (PAO) puisse favoriser l'élimination des parasites. Cependant, les quantités libérées au moment des pics de parasitémie semblent trop faibles pour jouer un rôle significatif dans la trypanotolérance ((Traore-Leroux et al., 1987), (Descamps, 2002)). D'autres

facteurs sériques pourraient affecter la multiplication ou la différenciation des trypanosomes sans nécessairement avoir un effet trypanotoxique. S'il s'avérait que de tels facteurs existent, leur identification pourrait constituer une voie de recherche dans la découverte de nouvelles méthodes de contrôle des parasites.

2.2 Les mécanismes immunologiques

La majorité des recherches menées sur la trypanosomose animale africaine ont été réalisées sur le modèle murin. Si ce choix se comprend aisément d'un point de vue pratique (protocoles expérimentaux moins coûteux, plus faciles à réaliser, et outils d'analyse de la réponse immunitaire mieux développés), il est cependant important de souligner ici que la souris n'est pas l'hôte naturel du trypanosome. De plus, les deux modèles murins et bovins possèdent des différences majeures notamment en termes de réponses immunitaires et de réponse à l'infection (Morrison et al., 2016).

On parle souvent de système immunitaire en général mais il est important de préciser qu'il existe deux systèmes interconnectés d'immunité : l'innée et l'adaptative. Ces deux systèmes communiquent entre eux via des contacts cellulaires et des messagers solubles tels que les cytokines.

2.2.1 Immunité innée ou non spécifique

L'immunité innée inclut des mécanismes moléculaires et cellulaires de veille permanente qui ont pour but de prévenir les infections ou d'éliminer rapidement les pathogènes présents. La détection de ces agents pathogènes par le système immunitaire inné est essentielle pour une protection précoce contre ces derniers et pour la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative efficace (Harris et al., 2006). Les éléments de reconnaissance du système immunitaire inné sont rapides (quelques secondes à plusieurs heures) mais ne sont pas très spécifiques.

2.2.1.1 Réactions cutanées locales

La peau constitue la première barrière essentielle entre l'agent pathogène et l'organisme. Elle héberge notamment de nombreuses cellules résidentes ainsi que des cellules immunitaires permettant de limiter voire d'arrêter l'infection en sécrétant des molécules inflammatoires ou en tuant directement l'agent pathogène. Cela comprend un ensemble de cellules phagocytaires professionnelles présentes dans le derme à l'état d'équilibre ou recrutées à la suite d'une infection (Bernard et al., 2014). Les premiers contacts entre le parasite et le système immunitaire de l'hôte ont lieu au niveau du site d'inoculation des trypanosomes (sous forme métacyclique) dans le derme, où les trypanosomes vont se multiplier activement avant de migrer vers les

organes lymphatiques et la circulation sanguine (Akol et al., 1986). Les trypanosomes vont être reconnus par des cellules phagocytaires telles que les macrophages et les neutrophiles qui sont des acteurs clés de la réponse immunitaire non spécifique. Ces cellules phagocytaires ont la capacité de sécréter des cytokines et des chimiokines qui attireront d'autres globules blancs au site de l'infection, initiant alors une réaction inflammatoire locale.

Le site d'inoculation des parasites peut parfois apparaître sous forme de furoncle douloureux, appelé chancre, qui ne dure que quelques jours. Plusieurs facteurs peuvent influencer sur la taille du chancre notamment l'espèce de l'animal-hôte, l'espèce et la souche de trypanosome ainsi que le nombre de parasites injectés par la glossine (Dwinger et al., 1987). Chez certains animaux sauvages trypanotolérants tout comme chez certains bovins trypanotolérants, ce chancre est peu ou pas perceptible et des périodes prépatentes (période entre le moment où l'animal est infecté et le moment où le parasite est détectable) plus longues sont parfois observées ((Murray et al., 1981), (Berthier, 2009)). Des études menées sur des zébus trypanosensibles et des taurins N'Dama trypanotolérants infectés expérimentalement par *T. congolense* n'ont cependant pas permis de confirmer le rôle de la réaction inflammatoire initiale dans la tolérance à la maladie ((Akol et al., 1986), (Paling et al., 1991), (Boulangé, 1995)). Il semblerait néanmoins, que les zébus montrent des réactions cutanées plus sévères que les N'Dama (Akol et al., 1986).

2.2.1.2 Activation du complément

Un des premiers mécanismes à se mettre en route dans la réponse immunitaire innée est le système du complément. Le complément est un complexe d'une trentaine de protéines sériques dont le composant C3 constitue le pivot. Le rôle de ce réseau de protéines sériques préexistantes est de participer activement à la défense de l'organisme contre les infections en favorisant l'opsonisation (processus biochimique par lequel une molécule recouvre la membrane d'une cellule cible pour favoriser sa phagocytose), la lyse directe d'agents pathogènes envahissants et l'induction et la régulation de la réaction inflammatoire ((Ricklin et al., 2010), (Lidani et al., 2017)). Dans des conditions normales, les molécules du système du complément sont inactives et circulent librement dans le sang. Elles s'activent lorsqu'elles interagissent avec des molécules des agents pathogènes et migrent vers le tissu infecté pour déclencher l'inflammation et éliminer l'intrus. Il existe trois voies différentes d'activation du système du complément : la voie classique (activation par l'intermédiaire de complexe immun antigène-anticorps), la voie alterne (initiée par les surfaces des pathogènes) et la voie des lectines (par l'intermédiaire des lectines qui s'associent à des motifs moléculaires associés aux pathogènes). Dans les deux dernières voies, le complément peut s'activer en l'absence d'anticorps et appartient de ce fait à l'immunité innée. Néanmoins, la voie dite classique d'activation débute par la reconnaissance d'anticorps et

fait, à ce titre, partie de l'immunité acquise ou adaptative. Le système du complément relie ainsi les réponses innées et acquises par l'activation des lymphocytes B et la synthèse d'immunoglobulines (Ig) ou anticorps (Lidani et al., 2017). Différentes études menées au cours d'infections par *T. congolense* et *T. vivax* ont mis en évidence une hypocomplémentémie chez des moutons (Malu and Tabel, 1986) et des bovins infectés ((Nielsen et al., 1978), (Rurangirwa et al., 1980), (Tabel et al., 1980)). Cette chute du taux sérique du complément coïncidait avec la première vague de parasitémie et semblait moins marquée chez les bovins trypanotolérants que chez les bovins trypanosensibles ((Nielsen et al., 1978), (Authié and Pobel, 1990)). En effet, après trois à quatre semaines d'infection, les bovins trypanotolérants retrouvaient des taux de C3 sérique proches de ceux avant infection. A l'inverse, les bovins trypanosensibles de type zébu ne retrouvaient qu'environ 10 à 20 % des valeurs normales initiales. Au sein de la race trypanotolérante Baoulé, une corrélation a été établie entre la capacité d'un individu à maintenir les niveaux de complément, la capacité à maintenir les valeurs d'hématocrite (PCV) et la survie lors d'infections naturelles (Authié and Pobel, 1990). Plusieurs mécanismes ont été évoqués pour expliquer cette hypocomplémentémie, notamment une activation et une consommation excessive des composants du complément *in vivo* par les complexes immuns formés par les anticorps dirigés contre les glycoprotéines variantes de surface des trypanosomes ((Kobayashi and Tizard, 1976), (Malu and Tabel, 1986)).

2.2.1.3 Le rôle du système hématopoïétique dans la trypanotolérance

Le phénotype trypanotolérant s'estime classiquement par deux traits majeurs qui sont la parasitémie et l'anémie. Pour rappel, un animal trypanotolérant manifeste une plus grande capacité à contrôler le développement de la parasitémie et à limiter l'anémie au cours d'une infection.

Une étude a été menée afin de comprendre quel était le rôle des cellules hématopoïétiques dans le déterminisme de la tolérance à la maladie. Ces cellules souches hématopoïétiques représentent un type de cellules primitives à l'origine de toutes les lignées de cellules sanguines. Elles émergent au cours du développement embryonnaire comme cellules endothéliales recouvrant la paroi des vaisseaux sanguins puis migrent vers le foie fœtal où elles se multiplient massivement avant de coloniser le thymus, la rate et la moelle osseuse. A la fois capable de s'auto-renouveler et se dupliquer, elle joue un rôle fondamental dans l'hématopoïèse, processus au cours duquel les cellules différenciées donneront naissance à trois lignées de cellules sanguines matures : les érythrocytes, les leucocytes ainsi que les thrombocytes (Chabannon and Mannoni, 1995).

Cette étude (Naessens et al., 2003) a été menée sur 20 animaux : cinq paires de bovins jumeaux chimériques N'Dama (*Bos taurus*) trypanotolérants/Boran (*B. indicus*) trypanosensibles ainsi que cinq N'Dama et cinq Boran, du même âge et singletons¹ produits par transfert d'embryon.

Les auteurs ont utilisé la tendance particulière du placenta de deux veaux jumeaux à fusionner in utéro pour produire des animaux avec un « patrimoine cellulaire » commun. En effet, il est bien établi qu'au début de la vie fœtale, les fœtus bovins jumeaux échangent dans le placenta des cellules souches hématopoïétiques par le biais de connexions (ou anastomoses) entre les vaisseaux chorio-allantoïdiens entraînant ainsi un chimérisme hématopoïétique avec partage des génotypes érythrocytaires et leucocytaires (Naessens et al., 2003).

Une fois nés, les veaux ont été infectés par *T. congolense* et les auteurs ont pu comparer la performance des veaux jumeaux N'Dama/Boran chimériques à celle de singletons des deux races. Les paires de jumeaux chimériques Boran/N'Dama ont été produites chez des vaches Boran receveuses par transfert d'embryon.

Cette étude a permis de mettre en évidence, tout d'abord, que la majorité des cellules hématopoïétiques chez tous les jumeaux chimériques étaient d'origine Boran. Les auteurs ont supposé que la migration des cellules précurseurs hématopoïétiques vers la moelle osseuse avait eu lieu plus tôt chez les fœtus Boran, entraînant ainsi un ratio plus élevé de cellules hématopoïétiques Boran chez les veaux jumeaux. Ainsi, les chimères N'Dama différaient des singletons N'Dama du fait que la majeure partie de leur système hématopoïétique était dérivée de leurs jumeaux Boran alors que les chimères Boran différaient peu des animaux témoins Boran.

Lors de l'infection, les singletons Boran ont présenté une anémie importante et une forte parasitémie alors que les singletons N'Dama ont présenté une anémie et une parasitémie transitoire, comme attendu. Néanmoins, si les chimères Boran ont développé des parasitémies et des degrés d'anémie comparables aux singletons Boran, les chimères N'Dama ont développé une anémie aussi sévère que celle développée par les zébus Boran (phénotype sensible), alors qu'ils ont réussi à contrôler leur parasitémie de manière similaire à celle des singletons N'Dama (phénotype tolérant).

Cette étude, aux résultats surprenants, a permis de mettre en évidence que la maîtrise de la parasitémie et le maintien de l'anémie seraient régis par deux mécanismes physiologiques indépendants. Le premier serait une meilleure capacité à contrôler la parasitémie et ne serait pas

¹ Animal singleton : veau (N'Dama ou Boran) issu d'une fécondation unique et ayant évolué seul dans l'utérus de la mère par opposition aux jumeaux chimériques de l'étude.

véhiculé par les cellules hémapoïétiques. Cette aptitude ne dépendrait donc pas du système immunitaire. Ce mécanisme serait probablement une caractéristique innée. Le second serait une meilleure capacité à limiter le développement de l'anémie et dépendrait de l'origine génétique des cellules hémapoïétiques.

Chez la race trypanotolérante N'Dama, l'hématopoïèse et plus particulièrement l'érythropoïèse, semble donc être beaucoup plus efficace pour le contrôle de l'anémie qu'elle ne l'est chez les animaux Boran trypanosensibles ((Naessens et al., 2002), (Naessens et al., 2003)).

Néanmoins, les auteurs n'excluent pas une influence possible de la réponse immunitaire puisque l'expérience a été menée dans un contexte particulier. En effet, les animaux ont été infectés par un clone de *T. congolense* et étaient naïfs vis-à-vis de la trypanosomose et ne pouvaient, de ce fait, pas développer une réponse mémoire. Or, (Paling et al., 1991) ont montré que les N'Dama deviennent de plus en plus tolérants au fur et à mesure des réinfections, laissant supposer un rôle important de la réponse immunitaire adaptative. De plus, les bovins ont été maintenus dans des conditions optimales et ont ainsi été soulagés de nombreuses pressions environnementales présentent habituellement dans des conditions de terrain (Naessens et al., 2003).

2.2.2 Immunité acquise ou spécifique

La réponse immunitaire spécifique, ou dite également adaptative, suit la réponse immunitaire innée. Le système immunitaire adaptatif regroupe l'immunité à médiation cellulaire (via les lymphocytes T) ainsi que l'immunité à médiation humorale (via les lymphocytes B et la production d'anticorps). Ces deux populations cellulaires impliquées ont des propriétés et des fonctions distinctes des cellules du système immunitaire inné.

La réponse immunitaire adaptative nécessite une présentation efficace des antigènes parasitaires par les cellules présentatrices d'antigènes aux lymphocytes T, l'activation des cellules B et T impliquant une reconnaissance spécifique entre les récepteurs des cellules et les antigènes et le développement de cellules et molécules effectrices. Ces mécanismes sont fortement régulés par de multiples signaux délivrés par les différents types cellulaires (myéloïdes et lymphoïdes) qui agissent en interaction pour orienter la réponse immunitaire (Vincendeau and Bouteille, 2006).

L'immunité adaptative met plus de temps à se mettre en place que l'immunité innée, les anticorps apparaissant plusieurs jours après l'infection. Elle est, cependant, bien plus spécifique des antigènes de l'agent pathogène et constitue une réponse mémoire. Toutefois, il convient de noter qu'il n'est pas possible de parler de ces deux types de réponse immunitaire de manière

totale­ment indépen­dante. Ainsi, les cellules pré­sen­ta­trices d'anti­gènes initient l'acti­vation des lymphocytes T, qui modulent ensuite l'acti­vation des macrophages. C'est pour­quoi je pré­sen­terai le rôle des macrophages dans cette partie.

2.2.2.1 Réponses humorales et production d'anticorps

Les trypanosomes infectant les bovins sont extracellulaires et intravasculaires ce qui les expose de fait aux cellules immunitaires de l'hôte. Cette localisation engendre ainsi une réponse immunitaire dominante de l'hôte à l'infection qui sera de type humorale (Taylor, 1998). Deux types principaux d'antigènes provoquent chez l'hôte vertébré une réponse immunitaire. Il s'agit des antigènes variables de surface (VSG : Variable Surface Glycoprotein) et des antigènes invariants.

Comme cela a été mentionné précédemment (cf. 1.2.3), le parasite échappe aux défenses immunitaires de son hôte mammifère grâce à la variation continue de ses antigènes de surface majeurs, les VSG (Pays, 1995). La production d'anticorps spécifiques, par les lymphocytes B (cellules B), contre les VSG de *T. congolense* constitue ainsi la principale réponse immunitaire ((Taylor, 1998), (Abrham, 2017)).

Il existe cinq classes différentes d'immunoglobulines (IgM, IgG, IgE, IgA et IgD). Les trois classes les plus fréquemment recherchées sont les IgM, IgG, et IgE. Les anticorps IgM et IgG permettent ensemble d'apporter à court et à long terme une protection contre l'infection et jouent un rôle essentiel notamment dans l'activation du complément par voie classique (cf. 2.2.2.2.1).

Lors de la première exposition avec le pathogène, le système immunitaire va produire des anticorps afin de combattre l'infection. Cette réponse initiale ou primaire, pouvant mettre jusqu'à deux semaines pour se mettre en place, se compose principalement d'anticorps de classe IgM. La production d'IgG a lieu plusieurs semaines après. Cette classe d'IgG contient 4 sous-classes (IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4) ayant des propriétés différentes et qui sont caractéristiques de la réponse immunitaire secondaire et de la mémoire. En effet, l'organisme va maintenir une petite quantité d'anticorps (un mélange d'IgM et d'IgG) à la suite de la guérison et lors d'une deuxième exposition avec le même pathogène, il réagira plus fortement et plus rapidement avec une réponse anticorps principalement de classe IgG.

Une des caractéristiques majeures de la trypanosomose murine et bovine réside dans l'activation polyclonale des cellules B, démontrée par un nombre accru de cellules B et d'immunoglobulines M (IgM) chez les animaux infectés ((Reinitz and Mansfield, 1990), (Taylor, 1998)). L'augmentation du taux d'IgM sérique survient dès l'apparition de la parasitémie. Cette dernière induit également la production d'anticorps de type IgG1. Au cours

d'une infection homologue, c'est-à-dire avec le même clone de trypanosome, ces anticorps seront alors capables de s'opposer au développement du variant porté par les VSG ayant généré leur production.

Des antigènes invariants intracellulaires sont également libérés lors la destruction des parasites par les anticorps et provoquent, à leur tour, des réponses anticorps essentiellement de classe IgG. Ces anticorps n'ont probablement pas d'incidence directe sur la parasitémie mais peuvent jouer un rôle non négligeable dans la neutralisation des toxines et autres produits dérivant du parasite, réduisant de fait les effets pathogènes dus aux trypanosomes. Cependant, les complexes immuns formés avec ces antigènes parasitaires entraînent une fixation massive du complément et contribuent de ce fait à l'hypocomplémentémie (Authie, 1993). De plus, leur accumulation au niveau des tissus peut déclencher des processus inflammatoires dommageables pour l'hôte. Il apparaît donc que la réponse anticorps chez l'animal infecté représente une épée à double tranchant (Taylor, 1998). En effet, ils montrent des actions antagonistes. Ils peuvent avoir un effet protecteur en intervenant dans l'élimination du parasite, des complexes immuns et éventuellement en neutralisent les produits parasitaires. Ils réduisent ainsi les effets pathogènes des parasites et donc la sévérité de la maladie. Mais, en contrepartie, ces anticorps peuvent avoir des conséquences potentiellement néfastes en favorisant l'inflammation tissulaire et en participant probablement à la phagocytose des globules rouges (Assoku and Gardiner, 1989).

Trois antigènes invariants majeurs ont été identifiés chez *T. congolense*. Il s'agit des antigènes de 23 kD (kilodalton) et de 33 kD correspondant à une cystéine protéase (ou congopaine) (Authié et al., 1993a) et de 69 kD correspondant à une protéine de choc ou HSP70, protéine homologue de la protéine de liaison à la chaîne lourde de l'immunoglobuline (Boulangé, 1995).

Des auteurs ont reporté, lors d'une infection expérimentale avec *T. congolense*, que les bovins trypanotolérants et trypanosensibles ont tous développé des anticorps dirigés contre ces antigènes. L'antigène de 23 kD induisit la production d'anticorps de type IgG1 alors que l'antigène de 69 kD induisit la formation d'isotypes IgM, IgG1 et IgG2. L'antigène de 33 kD induit des réponses de type IgM et IgG1 ((Authié et al., 1993b), (Authié et al., 1993a)). Cependant, les animaux tolérants de type N'Dama réagissaient de façon plus rapide à l'infection en produisant une réponse immunitaire humorale qualitativement et quantitativement différente de celle produite par les bovins de type Zébus sensibles ((Authié et al., 1993b), (Taylor et al., 1996b)). En effet, il apparaît que la race tolérante présentait des titres en anticorps IgG1 plus

élevé contre l'antigène de 33 kD (congapaine) et les VSG que la race sensible mais également que les bovins trypanosensibles auraient une moindre capacité à commuter d'une réponse IgM vers une réponse IgG (commutation d'isotype). De plus, les anticorps de type IgG1 dirigés contre l'antigène de 33 kD étaient détectables chez tous les animaux trypanotolérants et seulement chez certains bovins trypanosensibles. Des zébus sensibles, chez lesquels aucune réponse anticorps anti-congapaine n'a été observée, ont tous développé une anémie sévère nécessitant un traitement trypanocide (Authié et al., 1993a). Ainsi, cet antigène de 33 kD jouerait un rôle immunosuppresseur et la présence d'anticorps dirigés contre la congapaine de *T. congolense* semble être associée à une capacité de contrôle de la maladie ((Authié et al., 1993a), (Lalmanach et al., 2002)).

D'un point de vue immunologique, il semblerait donc que la principale caractéristique des bovins trypanotolérants résiderait dans une meilleure capacité à produire, de façon importante, une réponse IgG (principalement de type IgG1) contre des antigènes variants et invariants des trypanosomes.

Il est possible que l'immunosuppression soit une autre conséquence néfaste de la déplétion du complément au cours de l'infection par les trypanosomes. En effet, le C3 est nécessaire au développement d'une réponse immunitaire normale et à la génération de la mémoire immunitaire. De ce fait, il n'est pas exclu de supposer que la chute du taux de C3 puisse jouer un rôle dans le défaut de conversion isotypique IgM/IgG observés chez les animaux infectés. Une réponse efficace résiderait donc dans la combinaison de plusieurs facteurs tels que la réponse anticorps, l'activation du complément ainsi que l'activation des cellules phagocytaires (Taylor et al., 1998).

2.2.2.2 Réponses cellulaires

2.2.2.2.1 Activation des macrophages

Il est largement admis que les macrophages jouent un rôle central dans les réponses immunitaires innées et adaptatives et participent au maintien de l'homéostasie tissulaire.

Les monocytes circulants et les macrophages tissulaires sont des cellules myéloïdes possédant de très nombreuses fonctions, parfois antagonistes l'une de l'autre. Les macrophages ne sont pas simplement des cellules douées d'une activité phagocytaire, participant ainsi à l'élimination d'agents pathogènes mais assurent également de nombreuses autres fonctions, leur permettant de participer d'une part à l'élimination d'agents pathogènes mais également au processus de réparation tissulaire et de régulation de l'inflammation (Abrial, 2014). Ils sont notamment capables de présenter les produits de dégradation des agents pathogènes (antigènes)

aux lymphocytes T et jouent, à ce titre, en tant que cellule présentatrice d'antigène, un rôle important dans la réponse immune adaptative (spécifique). En fonction de l'environnement, les macrophages naïfs peuvent être activés par deux voies distinctes mais consécutives. On parle alors de polarisation des macrophages.

Les macrophages polarisés diffèrent en termes d'expression des récepteurs, de production de cytokines, de fonctions effectrices et de répertoires de chimiokines ((Mantovani et al., 2005), (Casella et al., 2016)).

On distingue ainsi schématiquement la voie dite « classique » de type M1 dont l'activité est pro-inflammatoire et la voie dite « alternative » de type M2 qui participe à la régulation de l'inflammation et au phénomène de réparation tissulaire. Ces différences de polarisation des macrophages ont des implications en termes d'expression des molécules de surface (récepteurs membranaires), mais aussi de synthèse de cytokines et d'activité fonctionnelle.

– La voie classique est induite par l'IFN γ produit par les lymphocytes T, de type CD4⁺ Th1, et par l'interaction avec le parasite. Cette voie conduit à la formation de macrophages de type M1, capables de sécréter diverses cytokines de type pro-inflammatoire telles que l'IL1, IL6 ou encore le TNF α . Ces macrophages activés vont ainsi permettre d'activer le système immunitaire. Ils ont la capacité de phagocyter les parasites opsonisés par les anticorps (complexe antigène-anticorps) mais également de produire des métabolites cellulaires trypanotoxiques, tels que le NO, participant de ce fait au contrôle du premier pic de parasitémie ((Mabbott et al., 1994), (Sternberg and Mabbott, 1996)).

– La voie alterne d'activation induit des macrophages de type M2 sous l'action de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL4, IL10 ou encore l'IL13. Ces cytokines sont produites par les lymphocytes T CD4⁺ dits Th2 ((Munder et al., 1998), (Munder et al., 1999)). Bien entendu, ces populations macrophagiques ne sont pas si dichotomiques que cela et présentent une certaine plasticité (Murray and Wynn, 2011). En outre, les macrophages M2 peuvent être distingués en trois sous-classes aux phénotypes différents ((Arango Duque and Descoteaux, 2014), (Martinez and Gordon, 2014)). Les macrophages M2a (« alternative ») sont induits par l'interleukine IL4 et l'IL13, les macrophages M2b induits par les complexes immuns, les agonistes des *toll-like receptors* (TLR) ou les récepteurs de l'IL1 et les macrophages M2c induits par l'IL10 et les hormones glucocorticoïdes (Mantovani et al., 2004). La description de ces types cellulaires a été essentiellement réalisée chez la souris et l'homme.

Une voie effectrice majeure des macrophages inflammatoires de type M1 est médiée par le NO (monoxyde d'azote ou oxyde nitrique) qui est synthétisé par la NO synthase inducible (iNOS ou NOS II) en utilisant la L-arginine comme substrat. Le NO s'est avéré être une

molécule effectrice antiparasitaire essentielle pour la protection de l'hôte mammifère ainsi qu'un médiateur potentiellement destructeur de l'hôte dans divers contextes d'immunopathologie. En effet, une polarisation M1 exagérée ou prolongée peut générer des dommages tissulaires qui entraînent une réponse inflammatoire macrophagique incontrôlée et pathologique (Marques et al., 2015). La voie métabolique alternative de la L-arginine est catalysée par l'arginase qui convertit la L-arginine en L-ornithine et en urée (Munder et al., 1999).

Lors de l'infection, les trypanosomes ont élaboré diverses stratégies leur permettant de moduler l'activité trypanocide des macrophages affectant ainsi la réponse de l'hôte mammifère à l'infection. En effet, il a été montré que les trypanosomes ont la capacité d'induire la différenciation des macrophages naïfs en macrophages M2 par la voie alterne d'activation ((Vincendeau et al., 2003), (Vincendeau and Bouteille, 2006)). Cette polarisation des macrophages favorise la croissance des parasites via la voie de l'arginase qui, à la fois, s'oppose à la synthèse de NO (Chang et al., 1998) mais également augmente la production de la L-ornithine, précurseur de la synthèse des polyamines essentielles au développement des trypanosomes ((Gobert et al., 2000), (Kropf et al., 2005), (Berthier, 2009)) (voir Figure 14).

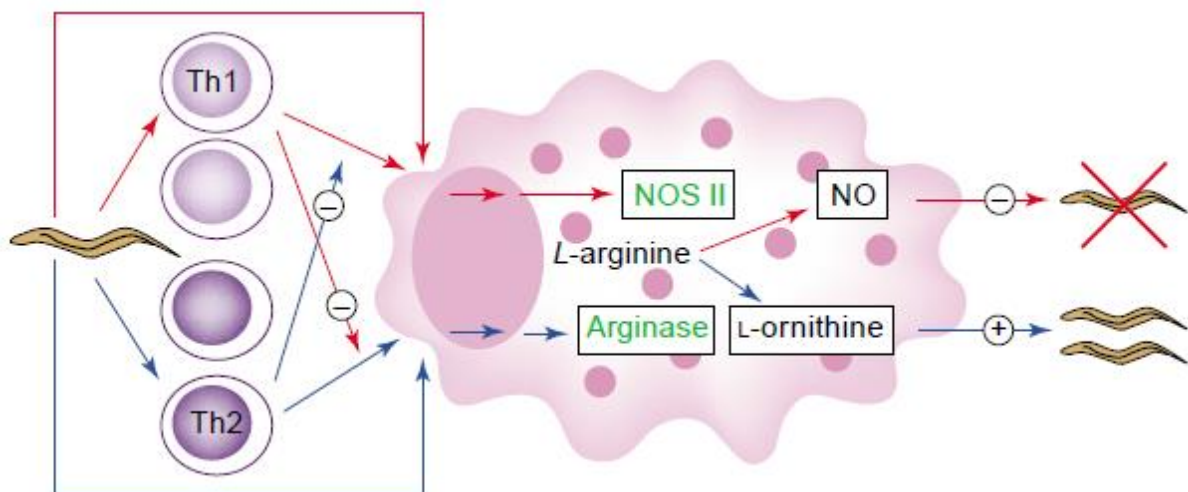


Figure 14 : Équilibre entre la NO synthase et l'arginase et l'effet des macrophages sur les trypanosomes (Vincendeau et al., 2003)

Les trypanosomes ont la capacité d'activer et de réguler de nombreux éléments de la réponse immunitaire de l'hôte qu'ils infectent, leur permettant ainsi de se développer et de se transmettre (Duleu et al., 2004). Il existe deux modifications majeures induites par ces parasites extracellulaires : une immunodépression importante se traduisant par une diminution drastique des lymphocytes T ainsi qu'une production d'anticorps accrue via l'activation des lymphocytes B (activation polyclonale).

2.2.2.2.2 Modulation des lymphocytes T

L'immunodépression est une caractéristique bien documentée de la trypanosomose chez les bovins et les souris ((Mansfield, 1990), (Taylor, 1998)). Les réponses prolifératives des cellules T sont réduites au cours de l'infection chez l'hôte (Taylor and Mertens, 1999). Il a été montré, chez des souris infectées par *T. brucei*, que l'activation des macrophages et la production de NO entraînent une immunosuppression des cellules T spléniques. Les auteurs ont ainsi suggéré que l'immunodépression compromet la capacité des animaux à contrôler la trypanosomose (Sternberg et al., 1994) ainsi que les infections secondaires. Néanmoins, si certains aspects de la réponse immunitaire sont communs entre la souris et le bovin (hypocomplémentémie, caractéristiques isotypiques de la réponse anticorps, activation polyclonale), les réseaux cellulaires et les cytokines impliqués dans ces réponses sont différents. En effet, plusieurs aspects de la réponse immunitaire bovine ont été décrits récemment et diffèrent considérablement de leurs homologues humains ou murins (par exemple, une fréquence accrue de sous-ensembles de lymphocytes T non conventionnels (Connelley et al., 2014) ou encore des familles de récepteurs de cellules NK très diversifiés (Allan et al., 2015)).

De nombreuses fonctions ont été décrites pour les cellules T $\gamma\delta$, notamment la production de cytokines, la présentation de l'Ag et la régulation immunitaire (Kabelitz et al., 2013). Chez l'homme et la souris, les lymphocytes T $\gamma\delta$ représentent moins de 5 % du nombre total de lymphocytes circulants. En revanche, le compartiment des lymphocytes T $\gamma\delta$ chez les ruminants représente 15 à 60 % du nombre total de lymphocytes mononucléés en circulation (Davis et al., 1996).

De façon générale, l'immunosuppression est moins prononcée et plus difficile à définir chez le bovin que chez la souris et les mécanismes sous-jacents n'ont pas été élucidés ((Authié et al., 1999)).

Une étude menée sur huit zébus Boran trypanosensibles au cours d'une primo-infection par *T. congolense* (ILNat 3.1) a mis en évidence une altération de la fonction des lymphocytes T dans le sang périphérique (PBMC), la rate et, en particulier, dans les ganglions lymphatiques (Flynn and Sileghem, 1991). Les auteurs ont remarqué que les lymphocytes T issus des ganglions lymphatiques provenant de bovins infectés ne réussissaient pas à proliférer en réponse à un stimulus mitogène (substance capable d'induire les divisions cellulaires) *in vitro* via l'utilisation de la concanavaline (Con A), une glycoprotéine connue pour induire la mitose et donc la prolifération des lymphocytes. L'hypothèse avancée lors de cette étude reposait sur le rôle clé de macrophages suppresseurs induisant la déplétion des lymphocytes T au niveau des ganglions lymphatiques. Néanmoins, il est difficile de généraliser un tel résultat dans la mesure

où ces observations ne portent que sur un seul animal à chaque fois (un animal était abattu toutes les semaines après l'infection).

Lors d'une expérimentation similaire, des auteurs ont également mis en évidence une réduction du nombre de lymphocytes T CD2⁺ et CD4⁺ au niveau des cellules prélevées sur des ganglions lymphatiques (Lutje et al., 1996). L'infection à *Trypanosoma congolense* chez des bovins trypanosensibles s'est avérée être associée à une profonde suppression du système immunitaire de l'hôte. Les cellules ganglionnaires de bovins infectés étaient incapables de sécréter in vitro de l'interleukine 2 (IL 2) après une stimulation par un mitogène et les auteurs ont également observé une altération de l'expression de la chaîne du récepteur de l'IL 2 (IL 2Ra) (Sileghem and Flynn, 1992).

L'infection de bovins N'Dama trypanotolérants (Lutje et al., 1995b) et de bovins trypanosensibles Boran (Lutje et al., 1995a) avec *T. congolense* a mis en évidence des réponses prolifératives spécifiques des lymphocytes T pratiquement restreintes aux nœuds lymphatiques.

Le macrophage resterait la cellule clé de l'immunosuppression. Cependant son activation et le rôle des produits issus de cette activation sont moins évidents chez le bovin que chez la souris. Alors que chez la souris, le TNF α , l'IFN γ , les prostaglandines et le monoxyde d'azote ou oxyde nitrique (NO) sont les principaux médiateurs de l'immunosuppression, chez le bovin, ces différentes molécules ne sont pas produites en quantités notoires et ne semblent pas jouer un rôle important dans le déterminisme de l'immunosuppression ((Taylor et al., 1996a), (Taylor, 1998)).

2.2.2.2.3 Rôle des cytokines dans la modulation de la réponse immunitaire

Le rôle des cytokines dans les mécanismes de la trypanotolérance a également été exploré. (Mertens et al., 1999) ont été les premiers à étudier l'association des réponses des cytokines avec la susceptibilité à la maladie chez des bovins infectés (tolérants et sensibles) par *T. congolense*. Les auteurs ont identifié des différences d'expression d'ARNm d'IL-4 et d'IL-6 entre les deux races bovines au cours de l'infection. L'expression la plus élevée de l'ARNm d'IL-4 a été observée 32 jours après l'infection chez les bovins N'Dama trypanotolérants. L'expression de l'ARNm de l'IL-6 a augmenté chez les bovins Boran trypanosensibles 11 jours après l'infection et a été élevée entre 21 et 32 jours après l'infection chez les deux races. Les auteurs ont émis l'hypothèse que les différences observées entre les profils des cytokines suggéraient un rôle protecteur possible de l'IL-4 et un rôle de promotion de la maladie pour l'IL-6 dans la trypanosomose bovine.

Afin d'examiner les différences de profils de cytokines susceptibles de conférer une tolérance/sensibilité à la trypanosomose bovine africaine, deux études consécutives ont été réalisées (qPCR dans ((O'Gorman et al., 2006)) ainsi que microarray et qPCR dans (O'Gorman et al., 2009) et ont permis d'étudier les changements d'expression géniques des PBMC (cellules mononuclées du sang périphérique) issues de bovins N'Dama trypanotolérants et de Zébus trypanosensibles infectés expérimentalement par *T. congolense*. Les niveaux d'expression d'un panel de 14 cytokines ont été profilés entre les races au cours de l'infection (O'Gorman et al., 2006), avec la technique de PCR en temps réel qui est beaucoup plus précise que la technique d'estimation visuelle d'intensité des bandes sur gel d'agarose utilisée par (Mertens et al., 1999) et (Naessens et al., 2002). Les résultats ont montré que les niveaux d'expression des gènes IL2, IL8 et IL1RN ont été significativement sous-régulés au cours de l'infection chez les deux races, ainsi qu'une sous-expression de l'IL4 (résultat en contradiction avec (Mertens et al., 1999)). De plus, ils ont observé une augmentation précoce des transcrits pour les gènes codant pour les médiateurs pro-inflammatoires (IFN γ , IL1A, TNF et IL12) chez la race N'Dama trypanotolérante 14 jours après l'infection. Enfin, au pic de parasitémie, les auteurs ont observé que les cytokines de type TH2 étaient dominantes chez les bovins Boran trypanosensibles. Des augmentations de la transcription des gènes IL6 et IL10 ont été détectées et de façon plus élevée chez le Boran que chez la N'Dama.

Les auteurs ont ainsi observé que les sens de variation d'expression des cytokines étaient identiques entre les N'Dama et les Boran au cours de l'infection, mais que les temps de réponses différaient. Ils ont ainsi suggéré que les bovins N'Dama trypanotolérants étaient capables de réagir plus tôt, lors de l'infection, par la production de cytokines de type Th1 pro-inflammatoires que les Boran trypanosensibles, ce qui pourrait expliquer pourquoi la race N'Dama contrôle la parasitémie de manière plus efficace aux stades précoces de l'infection.

L'étude suivante a révélé que de nombreux processus cellulaires étaient modifiés lors de l'infection. Les analyses GO (Gene Ontology) ont montré que certains processus biologiques étaient largement surreprésentés au cours de l'infection et selon la race. L'effet combiné d'un certain nombre de ces facteurs (impliqués dans les voies d'activation des cellules B, les réponses immunitaires innées, les réponses cytotoxiques et d'autres voies) peut entraîner une capacité supérieure de N'Dama à contrôler l'infection. Les résultats ont ainsi montré que les bovins N'Dama trypanotolérants réagissaient plus rapidement et de manière plus intense à l'infection que les bovins Boran trypanosensibles (O'Gorman et al., 2009).

La comparaison des réponses immunitaires entre les bovins trypanotolérants et trypanosensibles a montré certaines différences dans la réponse en anticorps (Authié et al., 1993b), le niveau de complément (Authié et al., 1993a), l'activation des macrophages (Naessens, 2006) et l'expression de cytokines (O'Gorman et al., 2006) mais, actuellement, il semble difficile d'évaluer leur contribution de façon directe. On ne sait donc pas si ces différences sont à l'origine de la tolérance à la maladie ou en sont une conséquence. Les différences entre les races étudiées, généralement la N'Dama et le zébu Boran, résident dans l'intensité des réponses ou leur date de déclenchement, et non pas dans des différences présence/absence.

3 Déterminisme génétique de la trypanotolérance chez le bovin

Différentes études phénotypiques, menées sur le terrain ou en infection expérimentale, ont suggéré que la trypanotolérance avait des bases génétiques.

Murray *et al.* ont tout d'abord suivi des zébus et des N'damas naïfs (jamais infectés préalablement par des trypanosomes), qui avaient été soumis ensemble au même challenge naturel : tous les zébus succombèrent aux infections (10 animaux sur 10), alors que seulement 3 N'Damas (3/10) moururent de trypanosomoses (Murray et al., 1981). Roelants *et al.* ont également observé une très forte mortalité chez des zébus Peul (10/10) et une mortalité plus modérée chez des Baoulés (5/10) lors d'un challenge naturel (Roelants et al., 1983). Des infections expérimentales furent ensuite réalisées sur des taurins N'Dama et des zébus Boran, qui étaient nés et avaient été élevés dans des zones libres de tsé-tsé. Ces infections ont clairement démontré la capacité des N'Damas à contrôler la parasitémie et à limiter l'anémie par rapport aux Boran (Paling et al., 1991).

Outre une différence marquée entre des zébus et des N'Dama élevés dans un même environnement, des études ont porté sur l'estimation de l'héritabilité des traits définissant la trypanotolérance. Pour estimer l'héritabilité, définie comme étant la part de variance génétique additive sur la variance phénotypique, soit la part de variance phénotypique qu'on peut expliquer par la génétique, des premiers travaux ont mesuré l'hématocrite et estimé la parasitémie d'animaux naturellement infectés sur le terrain et dont les pedigrees étaient partiellement ou totalement connus. Ainsi, (Trail et al., 1991) ont estimé l'héritabilité de l'hématocrite moyen comme étant de 0,64 ($\pm 0,33$) dans une population de N'Dama. Rowlands *et al.* ont quant à eux estimé l'héritabilité de l'hématocrite et de la fréquence des parasitémies positives dans une population de zébu est-africain à respectivement 0,32 ($\pm 0,07$) et 0,08 ($\pm 0,05$) (Rowlands et al.,

1995). Lors d'une infection expérimentale sur des animaux croisés de 2^e génération (F2) entre N'Dama et Zébu Boran, Van der Waaij *et al.* ont estimé l'héritabilité de l'hématocrite initial (valeur avant infection) à 0,88 ($\pm 0,24$), celle de l'hématocrite moyen lors de l'infection à 0,31 ($\pm 0,19$), celle de la fréquence des parasitémies positives à 0,09 ($\pm 0,11$) et celle de la valeur des parasitémies (moyenne du logarithme au cours de l'infection) à 0,18 ($\pm 0,15$) (Van der Waaij *et al.*, 2003).

En conclusion, les études ont montré que les races taurines et zébus présentent en moyenne des différences marquées quant à leur phénotype tolérant ou sensible, mais une forte variabilité interindividuelle existe. La trypanotolérance est un caractère à héritabilité modérée à faible, qu'elle soit estimée avec des indicateurs de l'anémie ou de la parasitémie, mais l'hématocrite paraît avoir une héritabilité supérieure à la parasitémie. A noter que sur le terrain, des facteurs environnementaux, tels que les maladies intercurrentes, la malnutrition, le surmenage, peuvent favoriser le développement de la maladie ((Murray *et al.*, 1982), ((D'Ieteren *et al.*, 1998)).

Partant du constat que la trypanotolérance est un caractère héritable, plusieurs études génétiques ont été réalisées dans le but d'identifier des régions chromosomiques et des gènes liés au phénotype trypanotolérant. Différentes approches ont été mises en œuvre afin de répondre à cette question.

Il me semble important de replacer cette étude dans son contexte afin de mieux comprendre les difficultés liées à la caractérisation des bases génétiques du caractère trypanotolérant.

Dans les régions endémiques de la nagana, il n'existe pas ou peu d'organisations de producteurs, ni d'organisation de l'élevage. Aucun système d'identification des animaux, ni aucun pedigree ne sont disponibles au niveau régional ou national. Il est donc difficile de travailler sur des populations bovines et de les identifier sans le soutien des éleveurs. L'élevage extensif évolue également dans un environnement difficile, défini par des saisons très marquées notamment des saisons sèches relativement éprouvantes pour les animaux. D'un point de vue pratique, il est nécessaire de pouvoir diagnostiquer la maladie sur le terrain avec du matériel de laboratoire adapté et suffisamment sensible. Néanmoins, les diagnostics ne sont pas parfaits et très souvent l'éleveur traite ses animaux sans savoir réellement si la maladie est due à des trypanosomes. Un point malheureusement central réside dans l'aspect financier. Un dispositif expérimental, en conditions locales, sur des bovins, hôte naturel des trypanosomes, coûte extrêmement cher et nécessite un appui technique important.

Le contexte local de l'élevage en Afrique de l'Ouest diffère ainsi grandement des systèmes rencontrés au Nord.

Enfin, la trypanotolérance bovine est un caractère à déterminisme complexe, puisqu'il est héritable, très multigénique ((Hanotte et al., 2003), (Van der Waaij et al., 2003)) et en interaction avec des facteurs environnementaux, tels la conduite d'élevage, l'alimentation ou encore la présence de maladies intercurrentes ((Murray et al., 1982), ((D'Ieteren et al., 1998))). Il n'existe, à ce jour, aucun marqueur qui permette de qualifier un individu de tolérant ou sensible. Les seuls « marqueurs » existants sont la capacité de certains bovins à avoir une anémie moins marquée et un meilleur contrôle de la parasitémie. Toutefois, ces traits ne sont visibles que lors d'une infection et ne peuvent donc pas être utilisés de façon prédictive i.e. avant l'infection chez l'animal.

Différentes études génétiques visant à identifier les régions chromosomiques et les gènes liés aux caractères de trypanotolérance ont été menées chez des bovins infectés par *Trypanosoma congolense*. Je les expose ci-après

3.1 Approche QTL

De façon mesurable, la trypanotolérance se traduit par un meilleur contrôle de l'anémie, de la parasitémie ainsi que de la perte de poids (Murray et al., 1984). L'approche QTL (Quantitative Trait Loci) ou locus à traits quantitatifs est une stratégie qui vise à identifier des régions du génome associées à des traits phénotypiques ici l'anémie, la parasitémie et le poids.

L'anémie se mesure généralement par l'hématocrite et correspond au taux de globules rouges sur le volume sanguin total et est exprimé en pourcentage. La parasitémie se mesure à l'aide d'un examen microscopique (cf. 1.4.1.1)

Un QTL est une région plus ou moins grande du génome (portion d'ADN) qui est étroitement associée à un caractère quantitatif. Autrement dit, il s'agit d'une région chromosomique où sont localisés un ou plusieurs gènes à l'origine du caractère (ou trait) en question. Reposant sur les propriétés de la méiose, cette approche utilise le fait que de larges segments chromosomiques sont transmis en bloc du parent au descendant avec conservation de l'association entre locus proches. De cette façon, rechercher des QTL consiste à rechercher des marqueurs dont le polymorphisme présente une association statistique avec le phénotype (Ytournal, 2008). On admet ainsi que plusieurs secteurs chromosomiques, portant un ou plusieurs gènes, sont impliqués dans le contrôle de ces caractères dits quantitatifs, et que de nombreux allèles sont responsables de la variabilité.

Afin d'identifier ces portions chromosomiques, des croisements ont été réalisés entre des bovins trypanotolérants (taurin N'Dama, importés de Gambie) et trypanosensibles (zébu Boran, une race kényane), présentant des phénotypes extrêmes, produisant ainsi une population d'individus dits F1 à l'ILRI (International Livestock Research Institute) au Kenya. Les individus F1 ont ensuite été croisés entre eux (ou avec la lignée parentale) produisant alors des individus F2 (ou « backcross ») qui présentaient une variabilité plus importante pour les caractères étudiés, et sur lesquels les phénotypes sont estimés. Le « backcross » ou rétrocroisement a permis d'obtenir des descendants ayant une identité génétique plus proche de celle du parent. Les populations ont ensuite été phénotypées, durant une infection expérimentale, et génotypées à l'aide de marqueurs microsatellites choisis de façon suffisamment dense pour couvrir tout le génome. La ségrégation des différentes portions chromosomiques sur la descendance, générée par la méiose et le tirage au sort des gamètes chez les F1, a permis d'associer des régions à un phénotype et donc d'identifier des QTL.

En 2003, Hanotte et ses collaborateurs ont publié les résultats de cette approche QTL basée sur les 177 individus F2 infectés expérimentalement par la souche IL1180 de *T. congolense* de type savane (Hanotte et al., 2003). Cette étude, menée sur une vingtaine d'années (à cause du temps de génération des différentes populations) a permis d'identifier 18 régions QTL sur plusieurs chromosomes contribuant aux trois principaux indicateurs de la tolérance : contrôle de l'anémie et/ou de la parasitémie et du poids. En additionnant les effets individuels sur un seul trait, la proportion de la variance phénotypique des caractères expliquée par ces QTL restait relativement faible (de l'ordre de 6 à 20 %) suggérant alors que plusieurs autres locus, voire des interactions complexes entre locus, pouvaient également influencer chaque caractère. Certains QTL situés sur les chromosomes bovins n° 2, nommé BTA2 (BTA pour *Bos Taurus*), BTA14, BTA17, BTA22, BTA25 et BTA27 ont été associés à un seul trait comme l'hématocrite (mesure de l'anémie) ou à la parasitémie (BTA4). D'autres ont été associés à plusieurs caractères comme par exemple BTA7 et, auraient des effets sur la parasitémie, l'anémie et le poids. De plus, les auteurs ont pu mettre en évidence que sur les 15 chromosomes ayant un effet positif sur la trypanotolérance, 7 haplotypes provenaient des taureaux N'Dama (BTA2, BTA7, BTA14, BTA22, BTA24, BTA26 et BTA27) et 2 étaient originaires des zébus Boran. De plus, 4 chromosomes (BTA4, BTA23, BTA25 et BTA29) ont montré des effets significatifs liés à la surdominance. Suite à ces observations, les auteurs ont suggéré que la sélection pour la trypanotolérance, dans un croisement F2 entre les bovins N'Dama et les bovins Boran, pourrait produire une race métisse ayant des niveaux de trypanotolérance plus élevés que ceux existant actuellement chez les races parentales.

Une étape importante a été franchie dans la compréhension du contrôle génétique de la trypanotolérance chez les bovins africains. Cependant, les QTL identifiés s'étendent sur de larges portions chromosomiques renfermant ainsi plusieurs centaines de gènes. Les intervalles QTL sont donc encore trop grands pour permettre une approche efficace du gène candidat. De plus, les QTL doivent être validés dans les populations non consanguines soumises à une infection naturelle (Dayo et al., 2009). Afin de réduire les intervalles de confiance sur les QTL identifiés, d'autres études ont été menées pour essayer de se rapprocher, voire d'identifier, des gènes causaux associés à ces traits phénotypiques. Cette étude a toutefois permis de mettre en lumière la difficulté de définir le phénotype tolérant de manière simple et précise. De plus, elle met en avant la nature polygénique d'un tel trait et montre également la complexité rencontrée lorsque l'on réalise des analyses génétiques dans le contexte de l'élevage local (durée de l'étude : 20 ans).

3.2 Étude d'association

Suite à ces premiers travaux génétiques, une étude d'association a été réalisée, chez des populations bovines dans les conditions naturelles de terrain, en utilisant des marqueurs microsatellites ciblant les zones QTLs préalablement identifiées. L'analyse d'association (AA) avait pour objectif de tester l'association statistique entre les allèles de marqueurs microsatellites et le phénotype trypanotolérant dans la population bovine préalablement phénotypée sur le terrain (en zone d'enzootie) au sud-ouest du Burkina Faso. Cette étude très novatrice a été basée sur le suivi, pendant deux ans, de troupeaux élevés par des pasteurs peuls dans le cadre d'un système d'élevage pastoral traditionnel au Burkina Faso, qui subissaient des infections naturelles à *T. congolense* ou *T. vivax* (Thevenon et al., 2007). L'hématocrite de 360 bovins a été mesuré une fois par mois pendant deux ans, et l'incidence individuelle a été estimée en associant la parasitologie, la PCR et la sérologie. En prenant en compte les effets saisons, éleveurs et infection, une variable correspondant à l'hématocrite moyen corrigé a été estimée pour chaque bovin et a représenté une estimation de la trypanotolérance (Dayo et al., 2012).

Un panel de 64 marqueurs microsatellites, ciblant 4 QTLs majeurs (Hanotte et al., 2003), a été génotypé sur 560 bovins phénotypés (Dayo et al., 2012). L'analyse d'association a ainsi identifié un marqueur microsatellite, MNB42 sur BTA04, dont certains allèles étaient fortement associés à l'anémie (Dayo et al., 2012).

3.3 Signature de sélection

Une approche complémentaire a également été utilisée, basée sur l'identification de signatures de sélection dans le génome de plusieurs races de bétail d'Afrique de l'Ouest. Cette

approche consiste à génotyper de nombreux marqueurs génétiques sur différentes populations, et à rechercher des marqueurs qui présentent des fréquences alléliques ou haplotypiques « extrêmes », les distinguant des autres marqueurs du génome : cette distinction peut être interprétée comme un écart à une évolution neutre de ces marqueurs par rapport au reste du génome, et donc une trace de sélection ((Smith and Haigh, 1974), (Schlotterer, 2003)).

Deux marqueurs microsatellites, sur BTA02 et BTA13, présentant une empreinte de sélection parmi les races trypanotolérantes, ont d'abord été mis en évidence (Dayo et al., 2009).

De plus, une équipe française du département de génétique animale de l'INRA a mené une recherche de signatures de sélection, à plus large échelle, sur un ensemble de neuf populations de bovins d'Afrique de l'Ouest (cinq populations taurines, deux populations de zébus et deux populations métisses) à l'aide d'une puce comprenant 54 000 marqueurs SNP (Gautier et al., 2009), permettant ainsi un criblage à plus haute densité du génome. (Gautier et al., 2009) ont identifié 53 régions du génome présentant des signes de sélection entre les races bovines. Une analyse intégrée de la fonction des gènes situés dans les régions identifiées a révélé que la plupart d'entre eux étaient impliqués dans la réponse immunitaire ou les fonctions et le développement du système nerveux (Gautier et al., 2009).

Récemment, une étude basée sur l'analyse comparative, à l'échelle du génome, de diverses races de bovins a été effectuée afin d'identifier le caractère distinctif génétique de la race N'Dama (Kim et al., 2017). Les génomes de cinq races africaines indigènes et de quatre races commerciales ont été séquencés. L'analyse des variants SNP entre les races bovines a permis de détecter des gènes contenant des variants génétiques spécifiques de N'Dama. L'analyse fonctionnelle a révélé que ces gènes sont associés à l'ossification, au système neurologique et au développement du système immunitaire. Si l'identification de sélection identifie des zones du génome qui ont vraisemblablement évolué en réponse à une pression de sélection, il est impossible de préciser si cette pression fut due aux trypanosomoses ou à d'autres contraintes sanitaires (maladies associées aux tiques par exemple) ou environnementales (forte chaleur et humidité, ressources alimentaires pauvres etc...).

3.4 Approche transcriptomique

Une autre approche utilisée pour étudier la trypanotolérance bovine est une approche fonctionnelle basée sur l'étude d'expression des gènes, le but étant de rechercher des gènes qui seraient différentiellement exprimés, au cours de l'infection, entre des bovins trypanotolérants et des bovins trypanosensibles.

Une première étude pilote, basée sur les aspects fonctionnels de la trypanotolérance, a été effectuée en utilisant la technique SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) ((Berthier et al., 2006), (Berthier et al., 2008)). Cette technique permet l'analyse, quantitative et simultanée, de l'expression des gènes à travers l'inventaire quasiment exhaustif des ARNm d'un échantillon donné (tissu, cellule...) (Velculescu et al., 1995). Techniquement, cela consistait à récupérer de courts fragments d'ARNm, à le cloner classiquement en bactéries et à le séquencer par la méthode Sanger.

Ainsi, l'étude visait à analyser le transcriptome de cellules sanguines de bovins trypanotolérants et trypanosensibles avant et pendant une infection par *Trypanosoma congolense*. Le transcriptome de trois animaux a été analysé, à savoir, un bovin de la race N'Dama (race trypanotolérante), un bovin de la race Baoulé (race trypanotolérante) et un bovin de la race Zébu Fulani (race trypanosensible). Cette étude a mis en évidence, chez les animaux trypanotolérants, une surexpression de certains gènes. Les gènes les plus pertinents codaient pour la $\beta 2$ microglobuline, un facteur plaquettaire, le lysozyme, le cytochrome B245 et un inhibiteur de protéase. Toutefois, le nombre limité d'animaux n'a pas permis d'associer sans ambiguïté certains gènes exprimés de manière différentielle au phénotype trypanotolérant. En effet, le séquençage n'était financièrement pas aussi accessible qu'aujourd'hui et cela explique le peu d'animaux au sein de l'étude. Cela implique ainsi qu'aucune extrapolation ne peut être faite puisqu'il existe une variabilité intra et inter individuelle non négligeable.

Par la suite, d'autres études ont également porté sur les variations d'expression des gènes notamment chez la race trypanosensible Zébu (4 individus) infectée expérimentalement par *T. congolense* (Hill et al., 2005). L'analyse de l'expression des gènes des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) via l'utilisation de puces à ADN a permis d'observer des différences significatives en ce qui concerne les gènes codant pour des protéines kinases (PKC) et des sous-unités du CMH de classe I ($\beta 2$ -microglobuline). Néanmoins, cette étude ne portant que sur la race trypanosensible, aucune comparaison n'a pu être faite avec des bovins trypanotolérants.

En 2009, O'Gorman *et al.*, ont affiné et complété les résultats obtenus précédemment en analysant l'expression des gènes, par puces à ADN, des PBMC (cellules mononucléées du sang périphérique) de 8 bovins N'Dama (tolérants) et de 8 bovins Zébu Boran (sensibles) au cours d'une infection par *T. congolense* (O'Gorman et al., 2009). Les analyses fonctionnelles (GO) ont révélé que certains processus biologiques étaient surreprésentés, selon la race, lors de l'infection. En effet, chez les bovins N'Dama, les gènes différentiellement exprimés étaient impliqués dans la production de cytokines, la régulation de la chimiotaxie ou encore l'activation des leucocytes. De plus, les résultats indiquent que les bovins N'Dama répondaient de façon plus précoce et plus

intense à l'infection comparativement aux bovins trypanosensibles. Les auteurs suggèrent ainsi qu'un sous-ensemble de gènes pourrait contribuer collectivement au caractère trypanotolérant chez la race N'Dama.

3.5 Croisement des résultats entre analyse QTL et microarrays

Enfin, une dernière étude s'intéressant à la trypanotolérance bovine a été publiée en 2011 : celle-ci a été menée sur des bovins trypanosensibles et bovins trypanotolérants infectés par *Trypanosoma congolense* (Noyes et al., 2011). Cette étude multigénomique associant les analyses de puces d'expression portant sur trois tissus (foie, rate, nœud lymphatique), le séquençage de banques EST de gènes présents dans une région QTL précédemment identifiée dans (Hanotte et al., 2003), et l'analyse de leurs polymorphismes SNP, a permis de mettre en évidence deux gènes candidats ARHGAP15 et TICAM1 impliqués dans la réponse immunitaire. TICAM1 était à la fois différentiellement exprimé au cours de l'infection, présent dans un QTL, et proche de marqueurs affichant un signal de sélection (Gautier et al., 2009). ARHGAP15, localisé dans un QTL, présentait des SNP non-synonymes entre N'Dama et Boran et appartenait à une voie de signalisation différentiellement exprimée au cours de l'infection. Toutefois, le séquençage des régions codantes de ces gènes dans plusieurs races bovines n'a pas permis de valider leurs rôles ((Bischoff et al., 2015), (Alvarez et al., 2016)). Il est néanmoins possible que des polymorphismes soient présents dans des zones régulatrices, en amont de ces gènes.

Cette étude a permis de mettre en évidence plusieurs voies biologiques fortement régulées au cours de l'infection, à la fois chez les bovins tolérants et sensibles : la cytotoxicité médiée par les Natural Killer (NK), la voie de signalisation des récepteurs des cellules T, la voie de signalisation des récepteurs des cellules B etc... Seules deux voies, l'interaction des récepteurs à cytokines et la signalisation des MAPK (mitogen-activated protein kinases) semblaient être associées à des gènes différentiellement exprimés entre races bovines.

Pour le moment, les informations disponibles sur les bases génétiques de la trypanotolérance sont :

1) L'existence de 18 régions QTL qui ont été mises en évidence lors d'infection expérimentale avec *T. congolense*, chez des croisements N'Dama x Zébu et ont été associées au contrôle de la parasitémie, à l'anémie et au poids (Hanotte et al., 2003).

2) Un marqueur microsatellite fortement associé au contrôle de l'anémie (Dayo et al., 2009) dans une population bovine soumise à la trypanosomose sur le terrain, et un autre marqueur présentant une signature de sélection, et proche d'un gène candidat (CXCR4) (Dayo et al., 2012).

3) De nombreux loci montrant des empreintes de sélection chez des bovins taurins d'Afrique de l'Ouest ((Gautier et al., 2009), (Kim et al., 2017)) et comportant des gènes candidats associés à diverses fonctions, et notamment la réponse immunitaire.

4) Deux gènes candidats ARHGAP15 et TICAM1 identifiés sur la base de leur localisation dans des QTLs et des données d'expression, mais dont leur rôle n'a pas pu être validé ((Noyes et al., 2011), (Bischoff et al., 2015), (Alvarez et al., 2016)).

Dans tous les cas, le phénotype trypanotolérant s'avère complexe, car les QTLs n'expliquent qu'une faible proportion de la variance phénotypique, et les données d'expression de gènes ne mettent pas en évidence de différences flagrantes entre les N'Dama et les Zébus Boran.

Par rapport à cette synthèse bibliographique, ma thèse s'inscrit dans l'objectif de contribuer à accroître les connaissances sur la trypanotolérance bovine : i) en étudiant cinq races locales, dont trois ont été largement négligées, ce qui permettra d'élargir l'éventail de la diversité biologique investiguée, ii) en utilisant la méthode RNA-seq, qui offre l'opportunité d'étudier des transcrits sans a priori chez l'hôte et le parasite, iii) en inférant les voies biologiques non seulement enrichies en gènes différentiellement exprimés, mais également en estimant leurs états d'activation ou d'inhibition, ce qui n'a pas été réalisé jusqu'à présent.

DEUXIEME PARTIE : PROJET DE RECHERCHE

1 Matériels et méthodes

1.1 Infection expérimentale des bovins

Mes travaux de thèse s'inscrivent dans le cadre du projet AATTOL (octobre 2011 à septembre 2015) « Caractérisation des bases moléculaires de la tolérance à la trypanosomose animale africaine : analyse conjointe des transcriptomes de l'hôte bovin et du parasite » financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR). Ce projet a pour objectifs de caractériser les bases moléculaires de la tolérance aux trypanosomoses et d'améliorer les connaissances sur les interactions entre les hôtes et leurs parasites. J'ai eu la chance de participer activement à cette étude dans le cadre d'un volontariat international (VI) entre mai 2012 et juin 2014, lors duquel j'ai été chargée du suivi des bovins infectés et de la réalisation des manipulations de laboratoire, en collaboration avec mes collègues du CIRAD et du CIRDES.

Afin d'étudier la dynamique d'expression des gènes entre bovins trypanotolérants et trypanosensibles au cours d'une infection, nous avons mené une étude expérimentale au Burkina Faso au sein d'un centre de recherche partenaire, le CIRDES (Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone Subhumide). L'infection expérimentale en condition contrôlée présente de nombreux avantages notamment l'homogénéisation de certains paramètres (alimentation, traitements reçus, animaux sous moustiquaire afin d'éviter toute dissémination du parasite ou toute contamination d'origine exogène), la facilité d'accès quotidien aux animaux ainsi que la maîtrise de la date d'infection. L'inconvénient réside néanmoins dans le nombre limité d'animaux suivis, environ 10 fois moins que ce qu'il est possible de suivre sur le terrain (Dayo et al., 2012) mais également le coût important d'un tel dispositif (achat et acheminement des bovins, suivi quotidien nécessitant du personnel qualifié, achat des aliments, traitements...). L'achat des animaux a nécessité une logistique importante et a été très chronophage puisque les races bovines étudiées proviennent de leur région d'origine à savoir : du Burkina Faso, du Bénin ainsi que du Mali (cf. 1.1.1).

Le protocole expérimental sur les bovins a été revu et approuvé par le comité d'éthique burkinabé (projet n° A002-2013/CE-CM).

1.1.1 Sélection des animaux

Le protocole global repose sur l'infection expérimentale de 40 bovins (8 bovins par race) issus de 5 races bovines locales d'Afrique de l'Ouest différant naturellement par leur sensibilité/tolérance aux trypanosomes. Les races bovines étudiées sont les suivantes :

Deux races bien connues :

- N'Dama : race trypanotolérante de référence (animaux originaires du Mali, région de Madina Diassa)
- Zébu Fulani soudanais : race trypanosensible de référence (originaire du Burkina Faso, région de Solenzo)

Trois races peu étudiées :

- Baoulé : race trypanotolérante (originaire du Burkina Faso, région du Lobi)
- Lagunaire : race trypanotolérante (originaire du Bénin, région de Samiondji)
- Borgou : race métisse (originaire du Bénin, région du Betecoucou et Okpara)

NB : Pour des raisons indépendantes de notre volonté, liée à la mort accidentelle d'un animal durant le transport entre le Bénin et le centre de recherche au Burkina Faso, la race Lagunaire comptait 7 animaux lors de l'infection. L'étude regroupe donc un total de 39 animaux issus de 5 races bovines.

Les différentes zones géographiques dont sont issues les 5 races bovines utilisées pour l'étude sont représentées sur la Figure 15.

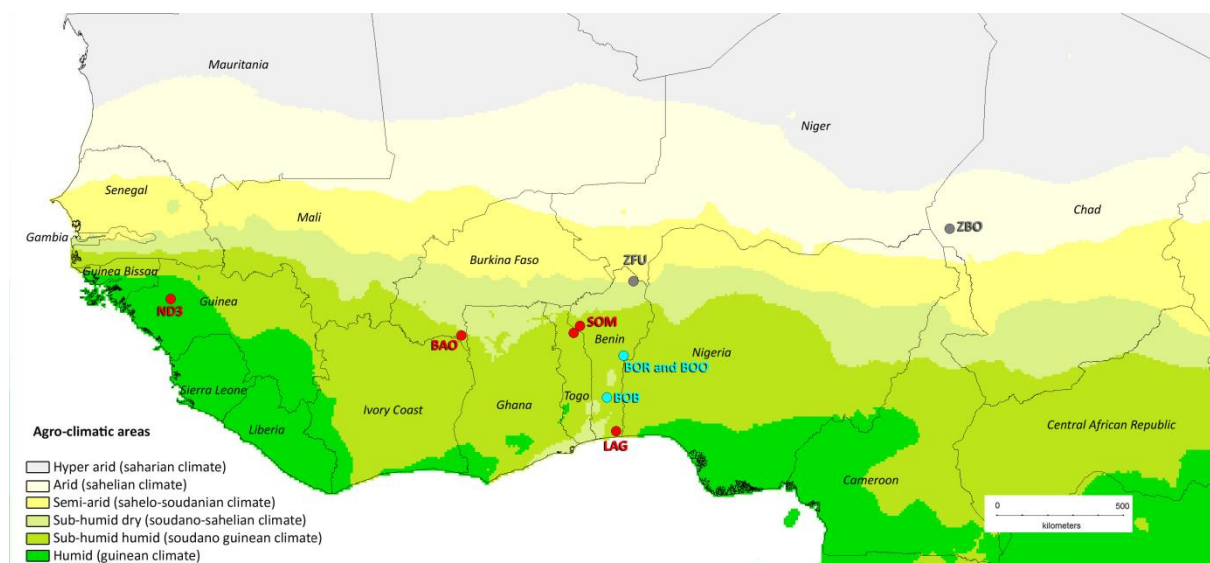


Figure 15 : Représentation des zones agro-écologiques d'Afrique de l'Ouest ainsi que des origines géographiques des 5 races bovines utilisées pour l'infection expérimentale

BAO : race Baoulé, BOR : race Borgou, LAG : race Lagunaire, NDA : N'Dama, ZFU : race Zébu Fulani. Les différentes zones ont été définies en fonction des précipitations annuelles issues de la base de données Worldclim. Carte réalisée avec DIVA-GIS version 7.5 et les données BIOCLIM. Les zones agro-écologiques se distinguent sur la carte par un gradient de couleur allant du blanc au vert correspondant respectivement à une zone : hyper aride, aride, semi-aride, subhumide sèche, subhumide humide, humide (Source : (Berthier et al., 2015)).

1.1.2 Critères d'inclusion

Les critères d'inclusion des animaux dans l'étude portaient, premièrement, sur le sexe de l'animal : seuls les mâles âgés de un à deux ans étaient sélectionnés. Ce choix a été motivé par plusieurs raisons. A l'inverse des femelles, les mâles ne subissent pas de variations hormonales majeures pouvant avoir une potentielle incidence sur l'infection. Deuxièmement, plus l'animal est jeune, plus les contacts avec le vecteur et la maladie sont faibles, le but étant d'avoir des animaux les plus naïfs possibles vis-à-vis de la maladie. Afin de connaître l'état sanitaire des animaux, deux types de diagnostic ont été réalisés : un diagnostic parasitologique utilisant le test de Murray (sélection si absence de trypanosomes dans le sang) et un diagnostic sérologique à l'aide d'un test ELISA indirect utilisant les antigènes totaux de *T. vivax*, *T. brucei brucei* et *T. congolense* (sélection si absence d'anticorps IgG spécifiques). Les animaux doivent être négatifs aux deux tests pour être inclus dans l'étude.

1.1.3 Adaptation à l'étable

A leur arrivée au CIRDES, les 39 bovins ont été gardés dans une étable sous moustiquaire. Ils ont été traités contre les vers intestinaux avec un anthelminthique par voie orale (albendazole, 2500 mg, Vermitan[®]), contre les parasites internes et externes avec un antiparasitaire injectable (ivermectine et clorsulon 0,2 mg et 2 mg/kg respectivement, Ivomec-D[®]), contre les trypanosomes avec un médicament trypanocide par injection intramusculaire (acéturate de diminazène à 7 mg/kg, Veriben[®]). Ils ont également été vaccinés contre la péripneumonie contagieuse bovine (PPCB) (Perivax[®]), la septicémie hémorragique ou pasteurellose (Pastovax[®]) ainsi que le charbon symptomatique (Symptovax[®]). Les multiples traitements ont été effectués 4 semaines avant le début de l'infection expérimentale. Afin de renforcer l'état général des animaux, une injection intramusculaire de 10 ml de Fercobsang[®] (fer, cobalt, vitamine B12, vitamine PP ou B3) a été réalisée.

L'observation phénotypique des bovins pouvant être insuffisante pour déterminer précisément leur race, les 39 bovins ont été caractérisés génétiquement, en utilisant des puces SNP comptant environ 50 000 marqueurs (Illumina BovineSNP50 chip assay v2), au sein du laboratoire d'Analyses Génétiques Animales ou LABOGENA (INRA, Jouy-en-Josas, France). Pour cela, avant l'infection, j'ai extrait l'ADN des bovins à partir de 100 µl de sang prélevé sur EDTA à l'aide du kit QIAamp DNA Blood Mini Kit[®] de Qiagen, selon le protocole du fabricant. L'analyse des génotypes fournis par LABOGENA a été effectuée par Laurence Flori, spécialiste de la caractérisation bovine. Les nouveaux génotypes ont été comparés à ceux existants, stockés actuellement dans la base de données WIDDE (<http://widde.toulouse.inra.fr/widde/>) contenant un grand nombre de races bovines ((Gautier et al., 2009), (Sempere et al., 2016)), à l'aide d'une

analyse en composante principale effectuée avec smartpca (Patterson et al., 2006), visualisée par ade4 sous R (Chessel et al., 2004), et une classification hiérarchique non supervisée à l'aide du programme Admixture (Alexander et al., 2009).

1.1.4 Infection des bovins et choix de la souche de parasite

L'infection expérimentale a été effectuée avec la souche *Trypanosoma congolense* IL1180 de type savane. Cette souche a été choisie car elle présente une pathogénicité intermédiaire (Bengaly, 2003) qui permet le développement chronique de la maladie. De plus, cette souche a été isolée sur un lion au Serengeti en Tanzanie (Geigy et al., 1973) ce qui nous garantit qu'aucun bovin de l'étude n'aurait pu être en contact avec cette souche de parasite auparavant. Sa dynamique d'infection est bien documentée et elle a été utilisée dans de nombreuses études ((Hanotte et al., 2003), (O'Gorman et al., 2006), (O'Gorman et al., 2009)). La voie d'inoculation intraveineuse a été choisie afin de contrôler parfaitement la quantité de trypanosomes injectés, ce qui n'est pas possible lors de l'inoculation par des glossines, mais également, afin d'éviter les interactions de la réponse immunitaire des bovins avec les antigènes de la salive des glossines (Somda et al., 2013). Les trypanosomes ont dans un premier temps été multipliés sur des souris, puis purifiés sur colonne DEAE-cellulose et, enfin, quantifiés sur des cellules de Malassez. Chaque bovin a alors été infecté avec une dose de 10^5 trypanosomes.

1.1.5 Suivi expérimental

Le suivi expérimental a eu lieu de juillet à décembre 2012. Plusieurs variables ont été mesurées avant et pendant l'infection. Des échantillons de sang ont été prélevés sur différents tubes au niveau de la veine jugulaire des animaux.

Afin de mesurer deux variables utilisées classiquement pour évaluer la trypanotolérance à savoir l'anémie (mesure de l'hématocrite correspondant au volume occupé par les globules rouges circulants dans le sang par rapport au volume total du sang exprimé en pourcentage : encore dénommé PCV : Packed Cell Volume) ainsi que la parasitémie ((Murray et al., 1984), (Hanotte et al., 2003)), cinq prélèvements ont été faits avant infection (jours : -25, -11, -7, -3 et -1) puis trois fois par semaine pendant l'infection à l'aide de tubes EDTA (anticoagulant). L'hématocrite a été lu pour chaque animal dans un tube capillaire après centrifugation pendant 5 min à 12 500 tour/min (voir Figure 8). La parasitémie a été notée selon la technique de la couche leuco-plaquettaire à contraste de phase ((Murray et al., 1977), (Paris et al., 1982)) et exprimée en nombre de trypanosomes/ml (cf. 1.4.1.1).

Les taux d'érythrocytes (globules rouges) et d'hémoglobine ont également été mesurés avant infection (jours : -7 et -3) puis tous les cinq jours en moyenne pendant les deux premiers mois de

l'infection et enfin toutes les deux semaines au cours des 2,5 derniers mois, en utilisant les procédures standard du système ABX. micros 60 (Horiba®). Les réticulocytes ont été recherchés avec du bleu de crésyl brillant (Merck®) conformément aux instructions du fabricant. Les réticulocytes sont les cellules précédant le stade d'érythrocyte lors de l'érythropoïèse, on parle d'hématies immatures. Leur particularité réside dans la présence, au sein de ces cellules, de ribosomes et de mitochondries. L'utilisation du bleu de crésyl brillant permet de distinguer sur un frottis les réticulocytes des hématies car ils contiennent des ARN ribosomiaux qui apparaissent colorés en bleu. Au final, 5 µl de sang de bovin ont été colorés avec 5 µl de solution saline (0,58 %) de bleu de crésyl brillant (150 mg/l) pendant 30 min. Des frottis sanguins ont ensuite été réalisés et ont été observés en immersion après séchage avec un objectif X100 ce qui a permis de compter les réticulocytes parmi 1 000 globules rouges. Les globules blancs totaux ont été comptés tous les quatre jours en moyenne, en utilisant l'observation directe avec une cellule de Malassez.

Enfin, des échantillons de sang ont été prélevés sur tube sec, une fois par semaine, afin de recueillir le sérum nécessaire pour effectuer une analyse ELISA indirecte qui consiste à détecter des anticorps IgG de l'hôte avec les antigènes totaux de *Trypanosoma congolense*.

Le poids a également été mesuré, une fois par semaine, à l'aide d'un ruban barymétrique.

1.1.6 Extraction d'ARN

Parmi les différents prélèvements effectués, des échantillons de sang ont été prélevés sur les bovins en utilisant des tubes d'ARN de prélèvement sanguin Tempus™ (Applied Biosystems, États-Unis) à quatre dates : une date avant l'infection (nommée DPI.0) et trois dates pendant l'infection, à 20, 30 et 40 jours post-infection (DPI : Day Post-Infection) nommée DPI.20, DPI.30 et DPI.40 respectivement.

Ces dates de prélèvements ont été choisies sur la base de connaissances bibliographiques. En effet, (O'Gorman et al., 2009) ont observé que le maximum de gènes différenciellement exprimés par les PBMC de bovins infectés était autour de 21-25 DPI. Nous nous attendions à observer les parasites dans le sang des bovins dès le 6-7^e jour (résultats d'infections expérimentales antérieures), et nous avions initialement prévu de récolter les ARNm pour le RNA-seq à 10, 20 et 30 DPI. Mais les parasites n'ont été observés dans le sang qu'à partir du 10^e jour et nous avons décidé de décaler les prélèvements pour RNA-seq au 20^e, 30^e et 40^e DPI, pour couvrir la période du maximum de parasitémie et d'entrée en phase chronique de la maladie.

Les tubes Tempus™, choisis pour récolter le sang total, contiennent un réactif, dont la composition, non fournie par le fabricant, permet de bloquer immédiatement la transcription de

l'ARNm ainsi que sa dégradation par les ribonucléases (ou RNases) cellulaires. Les tubes ont été stockés pendant 24 h à + 4 °C et les ARN totaux ont été extraits à l'aide du kit d'extraction d'ARN TempusTM Spin (Applied Biosystems, USA) conformément aux instructions du fabricant (Annexe 5). L'ARN a ensuite été élué en utilisant 80 µl de tampon sans RNase. Les échantillons ont été transportés en carboglace jusqu'au laboratoire de Montpellier. Isabelle Chantal a effectué la vérification de la qualité de 90 échantillons ARN (sur 360 extraits) à l'aide du BioAnalyzer, et la concentration de tous les échantillons à l'aide du Nanodrop avant l'envoi des échantillons à la plateforme MGX pour le séquençage RNA-seq.

1.2 RNA-seq

1.2.1 Principe

Si le génome est identique au sein de chacune des cellules d'un organisme donné (à quelques mutations près), les gènes peuvent avoir, en revanche, une expression génique spécifique en fonction du type cellulaire, du temps (propre à un stade du développement par exemple) et sous l'action de l'environnement (telle qu'un état pathologique ou encore en réponse à un stimulus particulier).

La technologie RNA-seq (séquençage de l'ARN ou RNA Sequencing) est une méthode relativement récente qui utilise ce que l'on nomme le « séquençage à haut débit » (high-throughput sequencing) ou « séquençage de seconde génération » (next-generation sequencing ou NGS). Elle est actuellement la méthode la plus utilisée pour les analyses du transcriptome à large échelle et permet ainsi d'identifier et de quantifier l'ARN issu de la transcription du génome dans un tissu, dans un état et à un instant donné et ce, sans a priori. Le transcriptome représente l'ensemble des molécules d'ARN présentes dans une population de cellules à un instant donné et reflète les gènes qui ont été exprimés de façon active.

Parmi les différentes technologies présentes sur le marché, on trouve la technologie Illumina qui a été celle utilisée dans le cadre de ce projet.

Cette technologie est basée sur une parallélisation massive des réactions biochimiques permettant la lecture de chacun des nucléotides composant l'ARN. Le séquençage consiste donc à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides pour un fragment d'ARN donné. Il est important de noter que, pour des analyses portant sur le transcriptome, l'ARN n'est pas séquençé directement mais il est converti par rétro-transcription en ADN complémentaire (ADNc). L'ADNc représente de ce fait la partie codante de la région du génome et ne contient donc que les exons. Ainsi, l'expression d'un gène est mesurée par la quantité de ses transcrits autrement dit, plus un gène est exprimé dans une condition biologique, plus les transcrits correspondants

sont synthétisés et donc plus les ADNc correspondants ont de chance d'être séquencés. Cette technologie permet donc de mesurer l'abondance de séquences d'ARN pour des milliers de gènes simultanément et permet ainsi de quantifier l'expression de ces gènes.

Le séquenceur fournit un nombre colossal de données correspondant à un ensemble de millions, voire de milliards de courtes séquences représentées sur l'alphabet {A, C, G, T} pour l'ADN (Peterlongo, 2016). Chacune des séquences lues est appelée une « lecture » issue du terme « read » en anglais. Le terme anglais « read » sera retenu pour la suite de ce manuscrit. Une lame de séquençage (ou flow cell) d'Illumina HiSeq 2000 comporte 8 pistes et plus de 140 millions de séquences sont attendues par piste.

Les différentes étapes du séquençage Illumina sont récapitulées dans la Figure 16.

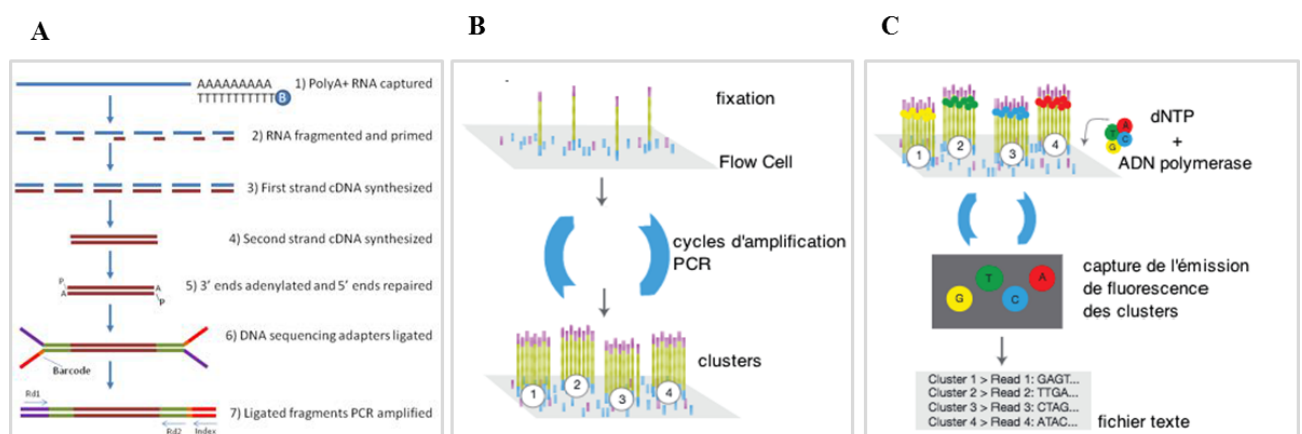


Figure 16 : Vue d'ensemble du séquençage Illumina, à partir d'ARN

(Source : www.labome.com/method/RNA-seq-Using-Next-Generation-Sequencing.html et (Illumina, 2016)).

A) La première étape consiste à récupérer puis à purifier l'ARNm d'un grand nombre de cellules sanguines à l'aide de billes sur lesquelles sont fixés des oligo-dT qui s'hybrident aux queues poly-A des ARNm. Ces ARNm sont ensuite fragmentés. Il s'ensuit alors la synthèse du premier brin de cDNA (rétrotranscription) puis du second brin sur lesquels seront fixés les adaptateurs (aux extrémités 5' et 3'). Les adaptateurs sont de courtes séquences spécifiques qui contiennent d'une part le primer nécessaire à l'amplification par PCR (étape suivante) et, d'autre part, un index (6 bases) unique par banque (ici nos échantillons animal-date). Cela rend alors possible le mélange (ou multiplexage) des banques lors du séquençage.

B) Chaque fragment est fixé à la surface de la « flow cell » (lame de verre composée de 8 pistes) puis amplifié par PCR. Il se forme alors des amas ou cluster correspondant chacun au même fragment initial d'ARNm.

C) Des réactifs de séquençage comprenant des nucléotides marqués par fluorescence sont ajoutés. Dans chaque cluster, une base est incorporée dans chaque fragment. Cette dernière émet un signal fluorescent qui sera enregistré. La longueur d'onde d'émission et l'intensité sont utilisées pour identifier la base. Ce cycle est répété jusqu'à l'obtention du fragment de taille souhaitée.

1.2.2 Création des banques RNA-seq et séquençage

La création des banques RNA-seq et le séquençage ont été réalisés par la plateforme MGX de Montpellier (www.mgx.cnrs.fr). Au total, 120 banques RNA-seq ont été construites. Ces banques correspondent aux 5 races avec 6 bovins par race et aux 4 points de prélèvement. La sélection des 6 bovins par race s'est basée sur différents critères : résultats issus du génotypage des races (test génétique qui confirmait l'affectation des animaux à la race attendue) (Berthier et al., 2015), bonne qualité (score qualité ou RNA Integrity Number ≥ 8.70) et quantité suffisante des ARNm pour chacun des points de prélèvement.

Les banques ont été réalisées à l'aide du kit *TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation kit* d'Illumina (Annexe 6), qui repose sur une première étape de récupération des ARNm avec des billes oligo (dT), une fragmentation chimique des ARN, la synthèse d'ADNc et des étapes d'amplification par PCR avant le séquençage proprement dit sur HiSeq 2000 d'Illumina. Les banques ont été multiplexées par lots de 12 échantillons (sélection aléatoire des bovins avec des blocs sur la date et la race), ce qui signifie que chaque multiplexe a comporté les quatre dates (3 échantillons par date) et différentes races. Cette combinaison a été choisie pour éviter d'associer un des effets qu'on souhaite analyser (race, temps, animal) avec un effet confondant qui aurait pu être introduit par des variations entre lots de séquençage. Chaque multiplexe a été séquençé sur 3 pistes d'un séquenceur HiSeq2000, ce qui permettait de s'attendre à environ 35 millions de séquences de 50 nucléotides par échantillon ((3 pistes * 140 millions de séquences)/12), qui ont été lues en **lecture simple** (« **single read** ») **orientée** (« **stranded** »). Le fait d'obtenir des séquences orientées (grâce au kit *TruSeq* d'Illumina) informe sur le sens de la transcription de l'ADN double-brin et donc sur le brin transcrit.

MGX a effectué un prétraitement informatique des données de séquençage, qui a consisté en : i) démultiplexer les séquences pour permettre la récupération d'un fichier par échantillon, ii) vérifier la qualité des séquences obtenues à l'aide du logiciel FastQC, iii) vérifier l'absence de contaminants issus d'autres organismes à l'aide de FastQ Screen. Cette étape de vérification de la qualité du séquençage est importante car elle permet d'avoir une vision globale de la qualité de notre jeu de données.

Toutes les données brutes ainsi que les différents logiciels utilisés sont stockés sur la plateforme Southgreen (cluster de calcul <http://www.southgreen.fr/>) et sont accessibles en lignes de commande via un terminal et une connexion sécurisée.

1.2.3 Alignement

Les données brutes de séquençage ont été enregistrées au sein d'un fichier FASTQ pour chaque échantillon. Après vérification initiale de la qualité des séquences avec le logiciel FastQC, les données ont été alignées conjointement sur les génomes de référence du bovin ainsi que du parasite *Trypanosoma congolense* à l'aide du logiciel STAR (version STAR 2.4.0j) (Dobin et al., 2013).

L'alignement, connu également sous le terme anglais « mapping », consiste à identifier la position physique (position des nucléotides sur les chromosomes des génomes des espèces considérées) des séquences obtenues. En théorie, cette position est unique lorsque la taille du read est suffisamment longue (>30 nt). La particularité de l'alignement des ARNm est la présence d'introns dans le génome, qui fait que des parties d'un ARNm s'alignent aux exons des gènes, qui sont séparés par des séquences introniques de taille variable au niveau de l'ARN (5215 nt en moyenne chez le bovin ((Chacko and Ranganathan, 2009)). L'algorithme de STAR, que je ne détaillerai pas ici, permet de chercher l'alignement d'une partie d'une séquence, puis, si la suite de la séquence ne s'aligne pas dans la continuité, de chercher à positionner la suite du read ailleurs dans le génome.

Choix des génomes de référence

On parle de génome de référence car ces génomes sont documentés : ils ont été séquencés, ont fait l'objet d'un gros travail de reconstruction des séquences par chromosome ou contig, ont été annotés et sont disponibles sur des bases de données publiques. On possède, par exemple, des informations sur la localisation des gènes, les positions de leurs introns et exons, le type de protéines pour lesquels ils codent ou encore leurs fonctions. Ces renseignements (sauf les fonctions) sont listés dans des fichiers d'annotations. Les informations (séquences des chromosomes et annotations) évoluent au fur et à mesure des travaux réalisés et sont régulièrement mises à jour. Il existe forcément des erreurs d'annotation, d'assemblage des séquences, ou bien tout simplement des absences d'information.

Le génome bovin est largement renseigné et est disponible sur la base de données Ensembl. J'ai utilisé la version de séquençage UMD 3.1 de *Bos taurus*, version 79 d'Ensembl. Il comprend

29 paires de chromosomes ainsi qu'une paire de chromosomes sexuels et la séquence mitochondriale, avec une taille globale d'environ trois milliards de paires de bases.

Le génome du trypanosome est disponible sur la base de données TritypDB, et j'ai téléchargé la version 9 de *T. congolense* souche IL3000. Il comporte environ 30 millions de paires de bases (<https://www.sanger.ac.uk/resources/downloads/protozoa/trypanosoma-brucei.html>). Il est important de noter qu'à l'exception de deux gènes connus, le génome du trypanosome (*Trypanosoma brucei*) ne contient pas d'introns (Kolev et al., 2010).

La séquence de chaque génome est téléchargeable au format FASTA et leur annotation au format GTF (« Gene Transfert Format ») pour le bovin et GFF (« General Feature Format ») pour le trypanosome. Ces annotations indiquent les coordonnées de chaque exon/gène/transcrit connu.

Alignement avec le programme STAR

Nous avons utilisé le programme STAR (version STAR 2.4.0j) (Dobin et al., 2013). En premier lieu, STAR a construit un index des génomes de référence. La fonction première d'un index est de pouvoir organiser et stocker en mémoire la ou les séquence(s) génomique(s) de référence pour ensuite l'(les)interroger facilement lors de la recherche de motifs particuliers. Par analogie, la séquence de référence pourrait être comparée à un texte dans lequel on souhaite effectuer des recherches successives de mots de longueurs variables qui seront dans notre cas les reads. Il est aisé de comprendre qu'une telle recherche est beaucoup plus rapide lorsque les données sont ordonnées selon un ordre lexicographique à l'image du dictionnaire.

L'alignement a ainsi été réalisé en quatre étapes à l'aide d'un script écrit en python par Guillaume Martin, chercheur à l'UMR AGAP :

- 1) Les deux génomes ont été utilisés en même temps. En effet, l'index STAR a été construit à partir d'un fichier FASTA unique obtenu par concaténation des fichiers de séquences du bovin et du trypanosome.
- 2) Les reads de toutes les librairies ont été alignés sur les génomes de référence indexés afin d'identifier les jonctions introns-exons.
- 3) Un nouvel index STAR a été généré à partir du fichier FASTA unique obtenu par concaténation des fichiers de séquences bovine et trypanosome (issus étape 1) et des informations sur les jonctions intron-exons (issues étape 2).

Différents paramètres ont été retenus dans cette analyse. Au maximum, trois erreurs (« mismatches ») ont été autorisées lors de l'alignement des reads. De plus, le mapping multiple a été autorisé jusqu'à 20 positions différentes en fonction des paramètres suivants : --alignIntronMin 50 --alignIntronMax 500000 --outFilterMultimapNmax 20 --outFilterMismatchNmax 4 --outSAMunmapped Within. L'autorisation d'erreur rend l'alignement plus sensible mais moins précis (compromis entre sensibilité et précision).

Un extrait de ce type de fichier est présenté dans la Figure 18.

Figure 18 : Extrait d'un fichier BAM/SAM

Chaque ligne représente un alignement : l'identifiant du read, avec l'identifiant de la séquence de référence (QNAME), un FLAG (précisant un alignement primaire ou secondaire en sens ou reverse), la position de l'alignement sur la référence (avec RNAME le chromosome et POS le numéro du nucléotide sur la séquence), MAPQ (la qualité du mapping), CIGAR (le code de l'alignement avec les matches et les mismatches), diverses informations (non renseignées ici), la séquence du read (SEQ) et sa qualité ainsi que divers indicateurs non présentés ici.

Le script de G. Martin a fourni directement des indicateurs sur les nombres de séquences alignées, qu'elles le soient façon unique ou de façon multiple. En outre, nous avons utilisé les outils Picard 1.130 (<https://broadinstitute.github.io/picard/>) et Samtools 1.2 (Li et al., 2009) pour évaluer le nombre de reads qui se sont alignés de manière conjointe sur les génomes de référence du bovin et du trypanosome, à l'aide d'un script écrit en shell par Guilhem Sempéré, chercheur dans mon unité.

1.2.4 Quantification des transcrits

L'étape de quantification consiste à compter le nombre de reads alignés de manière unique sur des gènes ou des exons connus des gènes. Nous avons choisi le programme featureCounts (Subread 1.4.6-p4, (Liao et al., 2014)) qui propose les deux sorties (par exons et par gènes). Il prend en entrée les fichiers de mapping (BAM) et les fichiers d'annotation des génomes du bovin et du trypanosome (GTF ou GFF). L'attribution des reads a été réalisée au niveau de l'exon puis rapporté au niveau du gène, en utilisant des paramètres par défaut (-t exon -g gene_id) et des reads orientés dans le sens reverse (-s 2).

NB : le fichier GFF du trypanosome a été transformé en GTF à l'aide du programme gffread de Cufflinks

Le comptage produit deux fichiers par échantillon, une matrice de comptage (.txt), qui donne le nombre de séquences alignées de façon unique et non ambiguë par gène annoté, et un fichier récapitulatif (.txt.summary) qui répertorie le nombre de reads « attribués » (ou comptés) et le nombre de reads « non attribués ».

Dans mon travail, j'ai choisi de garder les comptes issus des reads alignés de manière unique sur les génomes et attribués sans ambiguïté à un gène. Les autres reads ont été considérés comme non assignés, soit parce que le read s'alignait à plusieurs endroits dans les génomes, soit parce qu'il s'alignait à une position unique mais correspondant à deux gènes qui se chevauchaient au niveau de l'annotation (ambiguïté), soit parce que la position ne portait pas d'annotation. Ce

dernier cas peut être dû à une erreur de séquençage ou une portion non encore annotée dans le génome.

FeatureCounts suit le schéma de la Figure 19 pour attribuer des reads de façon unique à un gène.

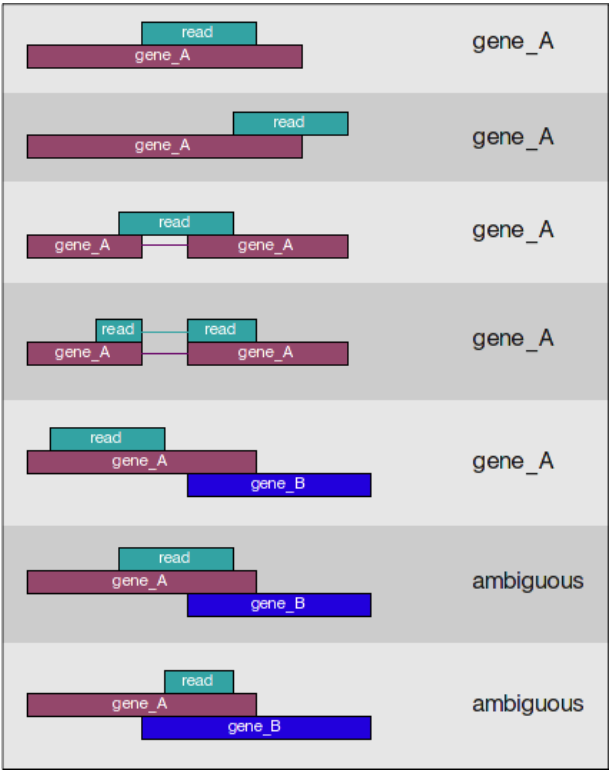


Figure 19 : Attribution d’un read à un gène (FeatureCounts)

À l’issue de l’alignement, j’ai obtenu une table de comptage dont un exemple est présenté dans le Tableau 1 : Extrait d’une table de comptage suivant.

Tableau 1 : Extrait d'une table de comptage

Geneid	Chr	Start	End	Strand	Length	lib100	lib101
ENSBTAG00000046619	1	19774	19899	-	126	0	0
ENSBTAG00000006858	1;1	34627;35016	35013;35558	++;	930	0	0
ENSBTAG00000039257	1;1;1;1	69695;70096	69712;70122	-;-;-;-	948	0	0
ENSBTAG00000035349	1;1	83323;83365	83347;84281	-;-	942	0	0
ENSBTAG00000001753	1;1;1;1;1	124849;1358	125014;1360	-;-;-;-;-	1972	0	0
ENSBTAG00000005540	1	264298	264843	-	546	12	10
ENSBTAG00000020035	1;1;1;1	351708;3550	351874;3552	++;++;	2273	542	418
ENSBTAG00000001150	1;1;1	401206;4022	401277;4023	++;+	795	0	0
ENSBTAG00000026259	1	421945	422280	+	336	0	0
ENSBTAG00000013841	1	459812	460830	-	1019	1	1
ENSBTAG00000011528	1;1;1;1	463572;4662	463746;4664	-;-;-;-	514	390	241
ENSBTAG00000026260	1;1	484627;4923	485297;4924	-;-	777	0	0
ENSBTAG00000045984	1;1;1	559139;5595	559158;5596	++;+	192	0	0
ENSBTAG00000012594	1;1;1	669920;6861	670481;6863	-;-;-	879	664	456
ENSBTAG00000046118	1;1;1	709515;7098	709876;7098	-;-;-	626	54	42
ENSBTAG00000047487	1	750707	750813	+	107	0	0
ENSBTAG00000018278	1;1;1;1;1;1	922635;9240	922700;9240	++;++;++;+	739	3580	2870
ENSBTAG00000021997	1;1;1;1;1;1	944294;9481	944442;9483	-;-;-;-;-	5553	530	288
ENSBTAG00000008490	1;1;1;1;1;1	1189228;119	1189283;119	++;++;++;+	1400	1150	748

Les échantillons sont en colonnes et les gènes en lignes. Geneid représente l'identifiant Ensembl des gènes bovins, Chr le chromosome, Start la base de départ d'un (des) exon(s), End la fin de fin d'un (des) exon(s), Strand le brin codant, Length la longueur de la séquence codante, et enfin les différents échantillons. Ici sont présentés les comptes des librairies 100 et 101 (avec 120 librairies au total). Ainsi, l'élément (i, j) du tableau correspond au nombre de reads issus de l'échantillon j et alignés sur le gène i.

1.3 Analyses statistiques

Une fois le nombre de séquences comptabilisé par gène et par échantillon, la prochaine étape a consisté à rechercher les gènes différentiellement régulés au sein d'une même race et entre les races au cours du temps. Je me suis concentrée sur l'étude des gènes différentiellement exprimés chez les bovins, au cours du temps au sein d'une race, ou entre races avant infection. Je n'ai pas analysé les séquences alignées sur le génome du trypanosome.

1.3.1 Différentiel d'expression

Le schéma expérimental sur lequel nous travaillons est complexe car nos données sont répétées sur les individus (données corrélées au niveau intra-individuel, cofacteurs comme la race et le temps). L'analyse du différentiel d'expression a été réalisée à l'aide du package Bioconductor EdgeR 3.18.3 sous environnement R ((Robinson et al., 2010a) et <http://www.R->

project.org). Il permet de modéliser les données de dénombrement des gènes selon une distribution binomiale négative et modère ainsi le degré de surdispersion entre les gènes. En effet, la distribution Binomiale Négative est une alternative à la distribution de Poisson quand il s'agit de modéliser des données pour lesquelles la variance empirique est supérieure à la moyenne empirique.

Une première étape a d'abord consisté à retirer les gènes faiblement exprimés en ne conservant que les gènes possédant plus d'un compte par million dans au moins deux librairies. Sur les 24 616 gènes bovins annotés dans la base de données Ensembl 79, 13 107 gènes ont passé le filtre.

Une étape importante et nécessaire pour l'analyse ce type de données réside dans la correction des différences techniques, tels que la taille des banques (c'est-à-dire la profondeur de séquençage).

La normalisation des données de comptage a été réalisée à l'aide de la normalisation TMM (Trimmed Mean of M-values) qui est par défaut du package EdgeR et suppose que la plupart des gènes ne sont pas différentiellement exprimés (Robinson et al., 2010b).

La dispersion a été estimée à l'aide du modèle de vraisemblance corrigée de Cox-Reid (Chen et al., 2014). Un diagramme de dispersion bidimensionnel a été lancé sur les données de comptage normalisées afin d'évaluer la structure globale des 120 échantillons (Ritchie et al., 2015). Il a été complété par une analyse en composantes principales (ACP) réalisée sur les comptes normalisés par million en utilisant mixOmics_6.3.0 (Le Cao et al., 2016) (paramètres center=TRUE et scale=FALSE).

Un modèle linéaire généralisé (GLM) a été ajusté pour chaque gène et des tests permettant de déterminer l'expression différentielle ont été réalisés à l'aide d'un test de vraisemblance (McCarthy et al., 2012).

1.3.2 Structure des contrastes

Afin de comparer le niveau d'expression des gènes au cours du temps au sein des races et entre les différentes races bovines, nous avons effectué 19 contrastes à l'aide du GLM.

Nous avons tout d'abord cherché à évaluer les différences basales qui pouvaient exister entre les races avant infection. Nous avons choisi de comparer les niveaux d'expression des gènes avant l'infection en utilisant la race Zébu trypanosensible comme référence. Deux raisons ont

motivé ce choix : i) la race ZFU était l'unique race indicine et ii) les échantillons de ZFU se sont placés sur une des extrémités de l'axe 2 du diagramme de dispersion (cf. 2.3.1).

Nous avons ainsi établi 4 contrastes, en comparant les races N'Dama (NDA), Lagunaire (LAG), Baoulé (BAO) et Borgou (BOR) à la race Zébu (ZFU) au temps 0 avant infection (DPI.0) qui sont modélisés par les flèches vertes sur la Figure 20. Ces contrastes entre races avant infection ont été nommés respectivement NDA.0-ZFU.0, LAG.0-ZFU.0, BAO.0-ZFU.0 et BOR.0-ZFU.0.

Ensuite, nous avons cherché à évaluer les différences qui pouvaient exister au sein d'une même race au cours de l'infection. Nous avons ainsi effectué 15 contrastes supplémentaires intrarace correspondants, pour chacune des 5 races, à la comparaison entre les trois points de prélèvements post-infection et la date précédant l'infection (DPI.20 par rapport à DPI.0, DPI.30 par rapport à DPI.0 et DPI.40 par rapport à DPI.0) et sont modélisés par les flèches bleues sur la Figure 20. Les contrastes ont été nommés en fonction de la race et des dates, à savoir BAO.20-0, BAO.30-0 et BAO.40-0 par exemple.

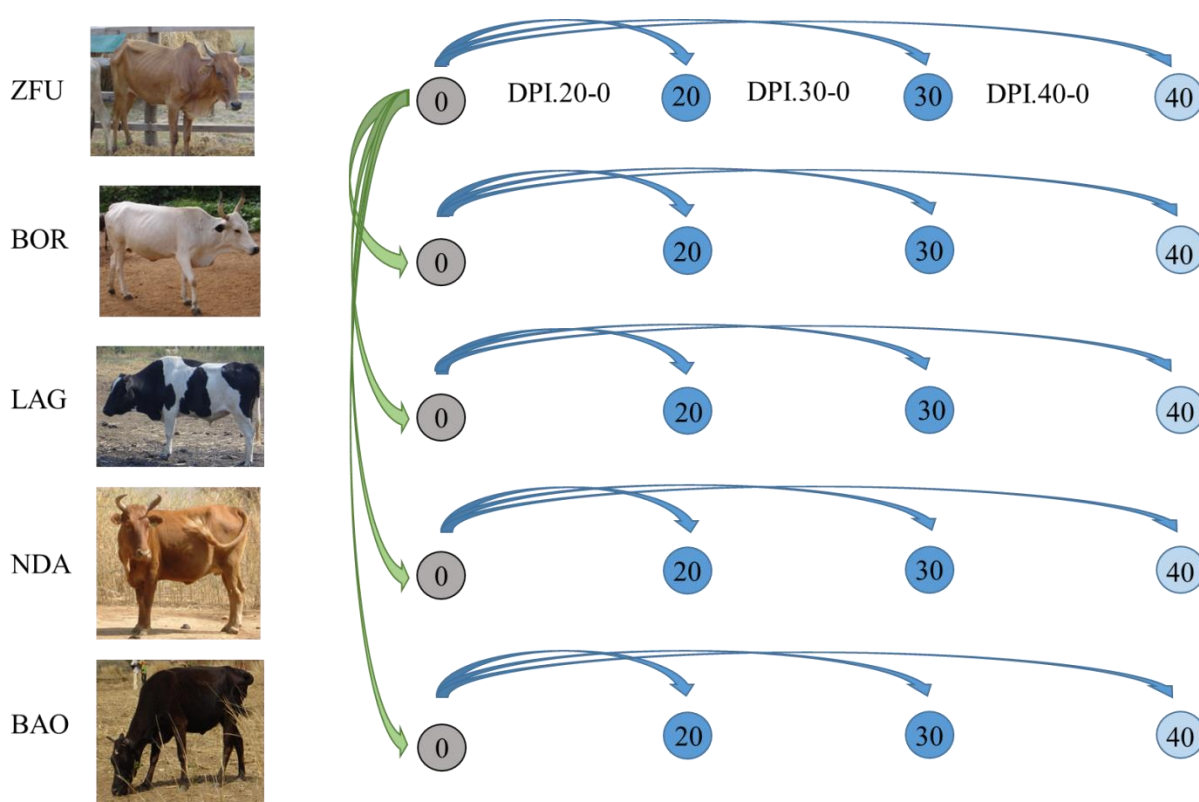


Figure 20 : Structure des 19 contrastes

Ce modèle fournit, pour chaque contraste et chaque gène, une valeur de LogFC (ratio qui mesure la variation de l'expression d'un gène entre 2 conditions autrement dit ratio qui mesure le

changement du niveau d'expression d'un gène) ainsi qu'un FDR (False Discovery Rate) correspondant aux valeurs de p-values ajustées selon la procédure de Benjamini-Hochberg (B-H) (Benjamini and Hochberg, 1995). En effet, lors de cette étape sont réalisés des tests statistiques indépendants sur plusieurs milliers de gènes simultanément. Cette méthode d'ajustement de la p-value consiste à contrôler le FDR, c'est-à-dire la proportion de faux positifs dans les gènes déclarés différentiellement exprimés (DE).

Lors de nos analyses, nous avons choisi un seuil de FDR de 10^{-3} pour dire d'un gène qu'il est différentiellement exprimé. Ce seuil peut paraître très strict, mais s'explique par le nombre élevé de contrastes que nous avons réalisés.

1.4 Analyse fonctionnelle

Le logiciel Ingenuity® Pathway Analysis (IPA®, version 43605602, 2018-04-04, <https://www.qiagenbioinformatics.com/products/ingenuity-pathway-analysis/>) a été utilisé pour effectuer l'analyse fonctionnelle sur les données d'expression des gènes. Il s'agit ici d'évaluer les voies biologiques et les réseaux de gènes différemment régulés chez les bovins en fonction du temps et de la race grâce à la base de données (Ingenuity Knowledge Base IKB) interne à IPA. Celle-ci fournit un référentiel d'interactions biologiques et d'annotations fonctionnelles créées à partir de millions de relations modélisées individuellement entre des protéines, des gènes, des cellules, des tissus ou encore des maladies, issues de la bibliographie. Ces relations sont révisées manuellement afin d'en vérifier l'exactitude et sont dérivées de revues scientifiques et d'un réseau important d'experts au sein de la communauté scientifique. Il est important de préciser que ce logiciel ne se base que sur les données fonctionnelles identifiées chez l'humain, le rat et la souris. Il utilise les identifiants Ensembl des gènes bovins qu'on lui fournit pour rechercher les gènes orthologues dans ces trois espèces. Il se peut donc que les résultats obtenus avec nos données bovines ne soient ni exhaustives ni exactes.

IPA® prend en entrée, pour les 19 contrastes, les fichiers contenant les 13 107 gènes analysés avec leurs identifiants Ensembl ainsi que les logFC et FDR associés.

Parmi les 13 107 gènes bovins analysés en différentiel d'expression avec EdgeR, il apparaît que 11 316 gènes ont possédé des correspondances dans la base de données IKB. Parmi les 1 791 identifiants bovins pour lesquels aucune annotation automatique n'a été trouvée, nous avons vérifié, via Ensembl Biomart, l'existence de gènes orthologues chez l'homme. Cette vérification a permis de voir que 577 gènes bovins avaient des orthologues humains avec un niveau de

confiance élevé et une correspondance un pour un. Pour ces gènes, les identifiants Ensemble humains ont été retenus au lieu des identifiants bovins.

Au total, 11 893 gènes bovins sont présents et renseignés dans la base de données IKB.

Trois grands ensembles fonctionnels sont renseignés dans IPA : fonctions biologiques et les maladies (DisFun), voies canoniques (CanPath) et molécules régulatrices en amont (régulateurs en amont, UpStream). L'identification des molécules régulatrices en amont et des mécanismes associés permet ainsi de fournir une compréhension biologique des changements d'expression observés. Les régulateurs en amont ne se limitent toutefois pas aux facteurs de transcription. Il peut s'agir de n'importe quel gène ou petite molécule qui a été observé expérimentalement ou non, et affectant l'expression des gènes de manière directe ou indirecte.

De plus, les gènes sont souvent modulés par plusieurs régulateurs en amont (parfois avec des effets opposés), et on ne sait pas a priori qui dominera dans un système particulier (Kramer et al., 2014).

En premier lieu, l'analyse fonctionnelle a identifié les fonctions/voies/molécules qui ont été enrichies dans chaque contraste, c'est-à-dire significativement associées à des gènes différentiellement exprimés. L'enrichissement a été estimé par le test exact de Fisher, qui calcule la probabilité, sous H_0 hypothèse nulle d'indépendance entre les gènes DE et une fonction/voie/molécule, que celle-ci comporte des gènes DE par rapport à la liste totale de gènes fournie. Plus la valeur de p-value est petite, moins il paraît probable d'obtenir une association sous l'hypothèse H_0 et donc plus l'association paraît significative.

En ce qui concerne les CanPath et DisFun, les valeurs de p-values corrigées pour les tests multiples par la méthode de Benjamini-Hochberg sont disponibles dans IPA et ont été utilisées et nommées B-H dans les parties suivantes.

En deuxième lieu, IPA fournit, sur la base du LogFC des gènes DE et des informations disponibles dans sa base de données concernant les régulations positives ou négatives entre gènes, des inférences sur les états d'activation des différentes fonctions. Il estime un z-score associés aux fonctions enrichies ou aux régulateurs. Ce dernier peut être utilisé pour trouver des molécules régulatrices probables sur la base d'une correspondance de modèles significatifs entre les données observées et celles attendues (Kramer et al., 2014). Le z-score permet donc de prédire la direction du changement de régulateur en amont.

De cette manière, un z-score ≥ 2 correspondait à une activation significative ou à un état accru d'une fonction ou d'un régulateur, alors qu'un z-score ≤ -2 prédit une inhibition significative ou un état décroissant d'une fonction ou d'un régulateur.

Les sorties IPA ont été visualisées à l'aide du package ggplot2 de R (<https://cran.r-project.org/web/packages/ggplot2/>).

Récapitulatif

Le schéma suivant (Figure 21) récapitule les étapes de l'analyse, depuis l'infection expérimentale des bovins jusqu'à l'interprétation fonctionnelle des résultats avec IPA[®].

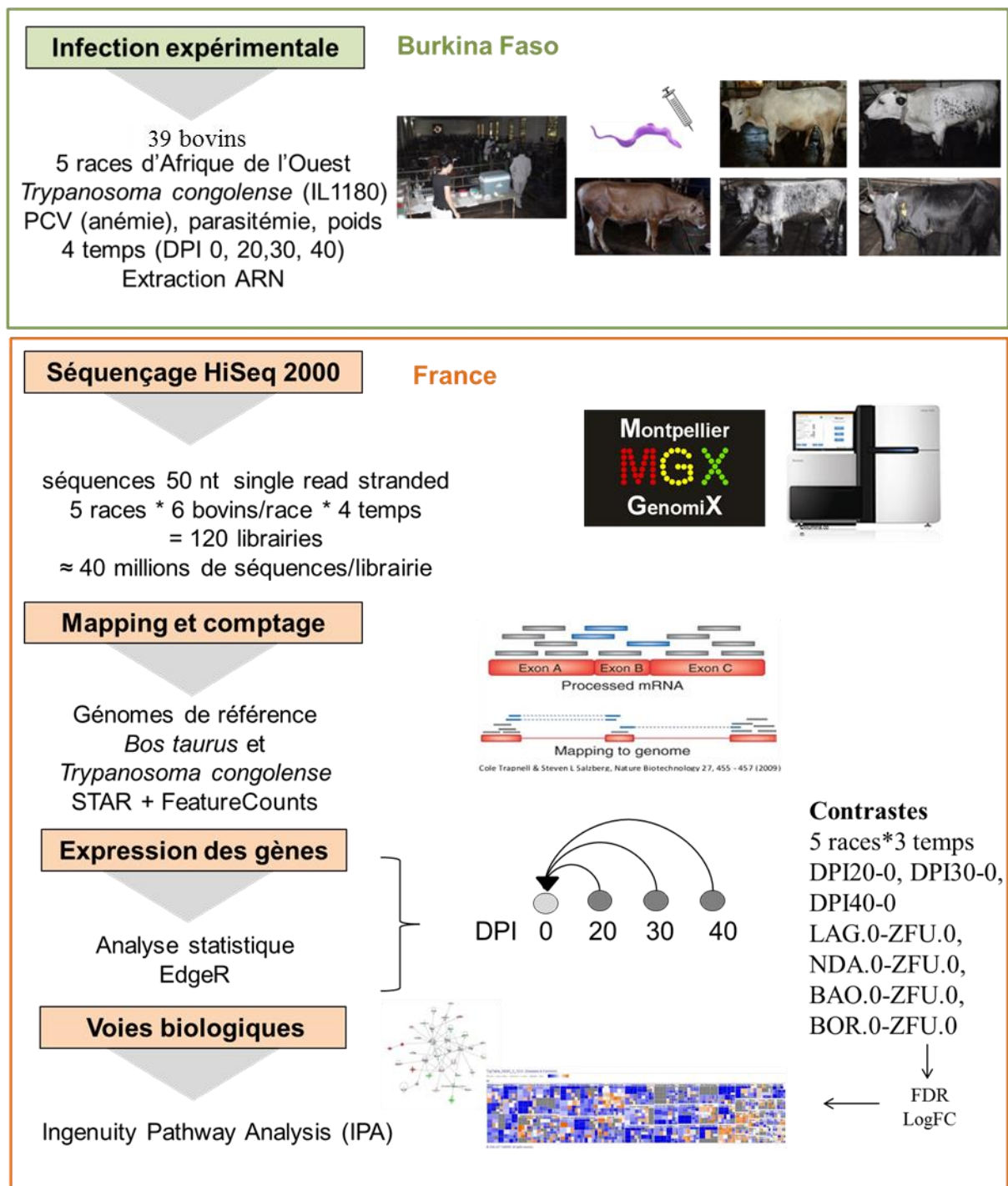


Figure 21 : Schéma regroupant les différentes étapes des méthodes proposées

2 Résultats

2.1 Phénotype et transcriptomes

L'infection expérimentale s'est déroulée entre le 1^{er} août, date à laquelle les animaux ont été infectés, et le 20 décembre 2013, date du traitement trypanocide. Pendant cette période, avec l'appui de David Berthier (présent pendant deux mois), et de mes collègues du CIRDES, j'ai piloté le suivi des animaux quasi quotidiennement, et j'ai analysé les résultats des prélèvements des 39 animaux pour estimer les phénotypes.

Je ne détaillerai pas ici les méthodes statistiques utilisées pour l'analyse des phénotypes. Les détails figurent dans l'article Berthier *et al.*, 2015, dans l'Annexe 2, les analyses statistiques ont été effectuées par Sophie Thévenon. J'en ressortirai ici les principaux éléments.

Les analyses de la parasitémie n'ont pas mis en évidence de différences que ce soit sur la date de la première détection des trypanosomes dans le sang (16 DPI en moyenne), ni même sur le niveau de la charge parasitaire (maximum autour de 10^5 trypanosomes/ml). Elles ont toutefois montré que, chez les bovins Zébu, les parasites étaient détectés plus longtemps que chez les races taurines, notamment la Lagunaire, qui a servi de référence dans les tests (voir Figure 22, qui présente les parasitémies des races Lagunaire, Borgou et Zébu seulement, pour plus de clarté).

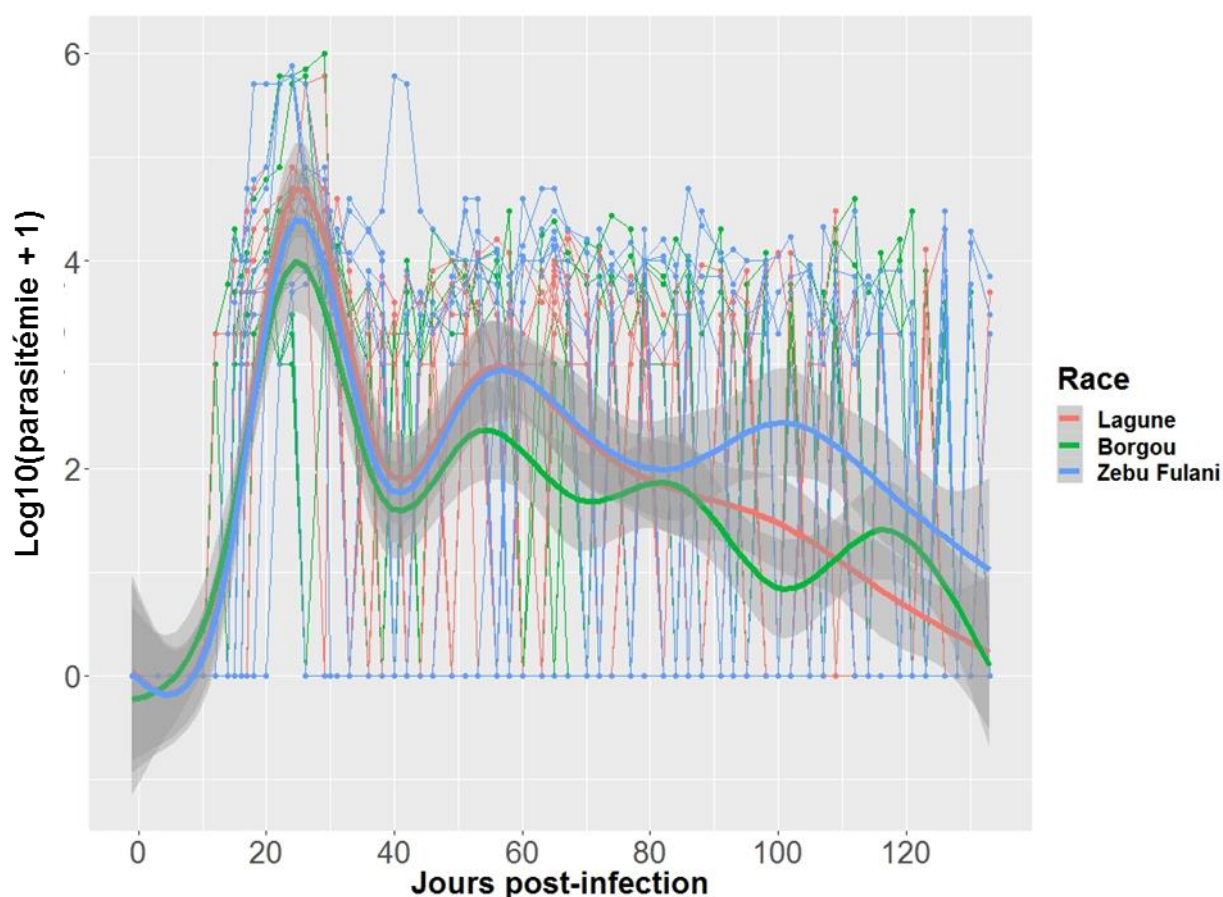


Figure 22 : Suivi de la parasitémie des bovins Lagunaire, Borgou et Zébus Fulani (ou Zébu peul)

En abscisse les jours post-infection, en ordonnée le log10 de la parasitémie (+1). Chaque ligne fine représente la parasitémie d'un animal, en orange un Lagunaire, en vert un Borgou, en bleu un Zébu. Les lignes épaisses correspondent à une valeur moyenne et en grisé son erreur-standard, estimées par la méthode gam du package ggplot2 et MASS.

En revanche, concernant les variables liées à l'anémie (hématocrite, concentration en hémoglobine, taux de globules rouges), les différences entre races sont très significatives : par ordre croissant d'anémie (PCV décroissant), on rencontre les taurins Lagunaire qui ont subi une anémie légère (hématocrite médian pendant l'infection de 30,4 [écart-type 1,3]), suivis par les N'Dama (hématocrite médian pendant l'infection de 28,6 [e.t. 1,4]) puis par les Baoulé (hématocrite médian pendant l'infection de 27,6 [e.t. 2,0]), et enfin les Borgou (hématocrite médian pendant l'infection de 26,1 [e.t. 2,9]) et les Zébu (hématocrite médian pendant l'infection de 25,5 [e.t. 2,3]), particulièrement anémiés. A noter qu'un Zébu a dû être traité par trypanocide avant la fin de l'expérimentation, car son hématocrite était descendu à 15 %, seuil que nous nous étions fixés comme point critique pour stopper l'expérimentation (voir Figure 23).

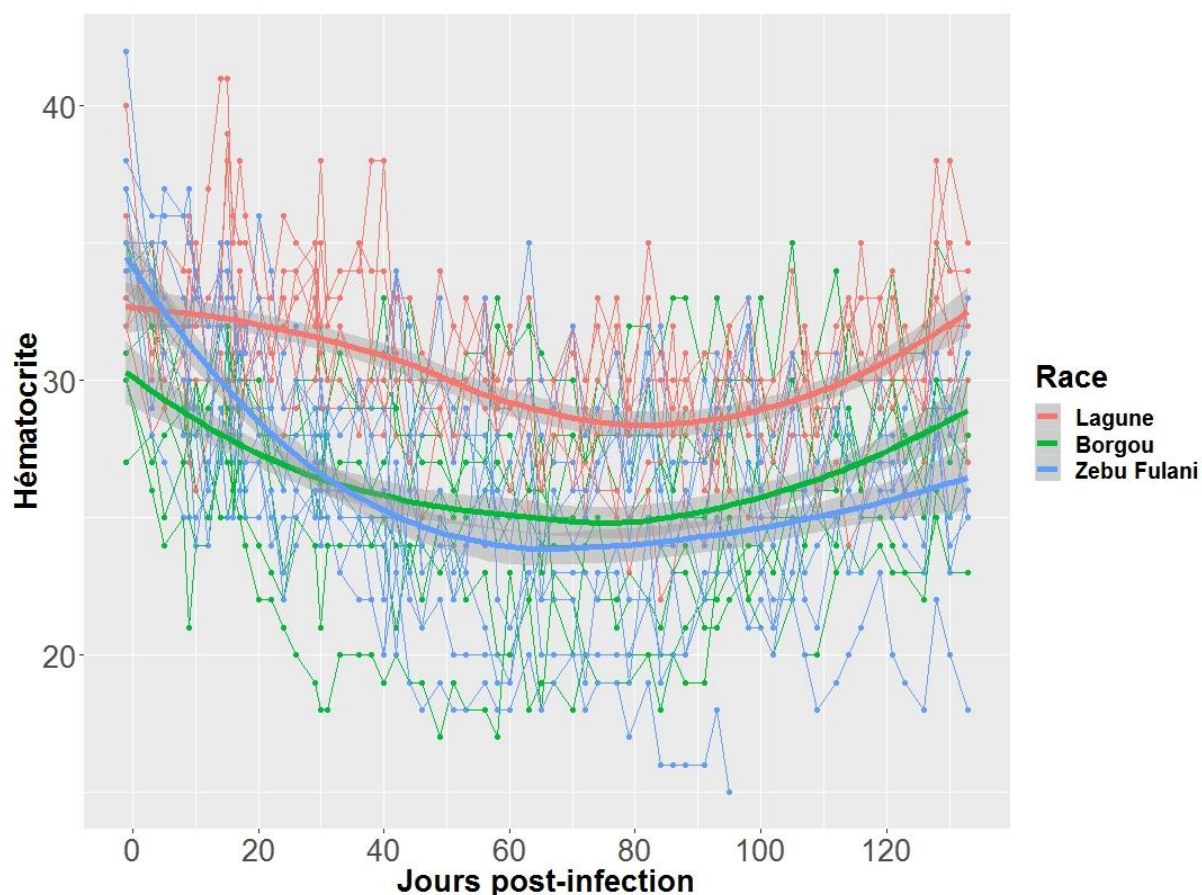


Figure 23 : Suivi de l'hématocrite des bovins Lagunaire, Borgou et Zébus Fulani (ou Zébu peul)

En abscisse les jours post-infection, en ordonnée l'hématocrite. Chaque ligne fine représente la parasitémie d'un animal, en orange un Lagunaire, en vert un Borgou, en bleu un Zébu. Les lignes épaisses correspondent à une valeur moyenne et en grisé son erreur-standard, estimées par le package ggplot2.

Enfin, les taux de globules blancs ont fortement augmenté chez tous les animaux, mais l'augmentation a été significativement plus importante chez les taurins que les Zébu, les Borgou présentant quant à eux un accroissement intermédiaire (voir Figure 24).

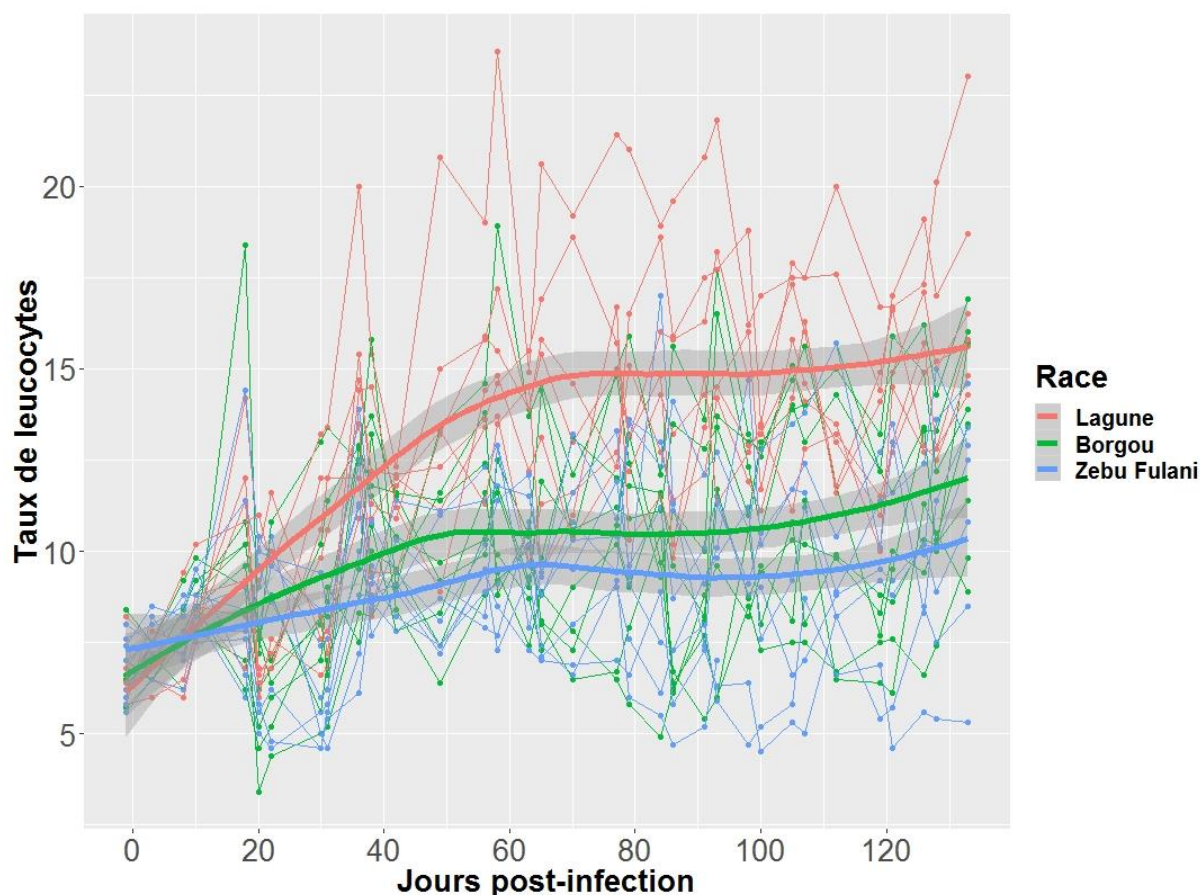


Figure 24 : Suivi du taux de leucocyte des bovins Lagunaire, Borgou et Zébu Fulani (ou Zébu peul)

En abscisse les jours post-infection, en ordonnée le taux de leucocytes, en nombre de millions de cellules par ml de sang. Chaque ligne fine représente la parasitémie d'un animal, en orange un Lagunaire, en vert un Borgou, en bleu un Zébu. Les lignes épaisses correspondent à une valeur moyenne et en grisé son erreur-standard, estimées par le package ggplot2.

Ces résultats, analysés au niveau de la race, masquent toutefois une forte variabilité entre individus, ce qui est bien sûr attendu lorsque l'on travaille en condition de terrain avec des animaux échantillonnés chez des éleveurs où les pratiques d'élevage sont différentes. Le « background » génétique, l'immunologie, les facteurs biotiques et abiotiques, peuvent également influencer sur cette variabilité. Néanmoins, cette étude a clairement permis de montrer que les taurins étaient peu anémiés durant l'infection. La Lagunaire est la race qui, dans cette étude, a conservé en moyenne l'hématocrite le plus élevé. Les Zébus Peul ont montré une anémie significativement plus prononcée, et les Borgous, race métisse, ont présenté un phénotype intermédiaire entre ces deux groupes.

Cette étape d'infection expérimentale et d'analyse des phénotypes a donc mis en évidence des différences phénotypiques importantes entre les races taurines, trypanotolérantes, et la race

zébu Peul trypanosensible, et a constitué la base de l'analyse du transcriptome. Au final, les dates de prélèvements utilisés pour le RNA-seq ont correspondu pour DPI 20 à la montée de la parasitémie, pour DPI 30 au pic de parasitémie, et pour DPI 40 à la transition vers la phase chronique de la maladie, quand les parasitémies deviennent fluctuantes. Il faut préciser qu'on n'a pu placer les dates de prélèvements des tubes Tempus par rapport aux variables phénotypiques qu'a posteriori, car au moment du prélèvement, on ne pouvait pas connaître l'évolution de l'infection dans les jours qui ont suivi.

La caractérisation génétique effectuée par Laurence Flori à l'aide de marqueurs SNP a révélé quelques surprises concernant deux Baoulés, qui se sont révélés introgressés avec une estimation à environ 20 % d'allèles d'origine zébu alors qu'ils étaient phénotypiquement semblables aux autres Baoulés. Ces deux animaux n'ont donc pas été sélectionnés pour l'analyse RNA-seq. Le Tableau 2, fourni par Laurence Flori, récapitule pour chaque animal les pourcentages estimés de marqueurs d'origine taurine européenne (attendue à 0 %), taurine africaine et zébu, à l'aide du logiciel Admixture.

Tableau 2 : Taux d'admixture des animaux de l'expérimentation

Code_animal	Race théorique	Taurin Européen	Taurin Africain	Zébu	RNA-seq
BAO_1_5971	BAO	0.00	1.00	0.00	X
BAO_2_5972	BAO	0.00	0.99	0.01	X
BAO_3_5973	BAO	0.00	0.97	0.03	X
BAO_4_5974	BAO	0.00	1.00	0.00	X
BAO_5_GA6	BAO	0.00	0.80	0.20	
BAO_6_GA7	BAO	0.00	0.71	0.29	
BAO_7_GA8	BAO	0.00	1.00	0.00	X
BAO_8_GA10	BAO	0.00	0.99	0.01	X
BOR_1_6501	BOR	0.01	0.60	0.39	X
BOR_2_6504	BOR	0.00	0.62	0.38	X
BOR_3_6587	BOR	0.00	0.63	0.37	
BOR_4_6649	BOR	0.00	0.63	0.37	X
BOR_5_9512	BOR	0.00	0.59	0.41	X
BOR_6_9524	BOR	0.00	0.62	0.38	X
BOR_7_9530	BOR	0.00	0.59	0.41	X
BOR_8_9537	BOR	0.00	0.54	0.46	
LAG_1_5262	LAG	0.00	0.94	0.06	X
LAG_2_5264	LAG	0.00	0.95	0.05	X
LAG_3_5268	LAG	0.00	0.93	0.07	X
LAG_4_5280	LAG	0.00	0.91	0.09	X
LAG_5_5296	LAG	0.00	0.92	0.08	X
LAG_6_5309	LAG	0.00	0.92	0.08	X
LAG_7_5322	LAG	0.00	0.89	0.11	
NDA_1_29012	NDA	0.00	0.91	0.09	X
NDA_2_29140	NDA	0.00	0.91	0.09	
NDA_3_29147	NDA	0.00	0.91	0.09	X
NDA_4_32000	NDA	0.00	0.92	0.08	X
NDA_5_32001	NDA	0.00	0.93	0.07	X
NDA_6_36002	NDA	0.00	0.92	0.08	X
NDA_7_36011	NDA	0.00	0.89	0.11	
NDA_8_36014	NDA	0.00	0.92	0.08	X
ZFU_1_SLZ01	ZFU	0.00	0.40	0.60	
ZFU_2_SLZ04	ZFU	0.00	0.35	0.65	X
ZFU_3_SLZ05	ZFU	0.00	0.36	0.64	X
ZFU_4_SLZ06	ZFU	0.00	0.36	0.64	X
ZFU_5_SLZ10	ZFU	0.00	0.36	0.64	X
ZFU_6_SLZ12	ZFU	0.00	0.35	0.65	X
ZFU_7_SLZ14	ZFU	0.04	0.34	0.62	
ZFU_8_SLZ17	ZFU	0.00	0.37	0.63	X

Avec le code de l'animal, la race attendue, le pourcentage estimé d'origine taurine européenne, taurine africaine et zébu. En rouge : les deux Baoulé avec une forte proportion

d'allèles d'origine zébu. En surligné : les animaux s'écartant un peu de la moyenne de leur race. La dernière colonne récapitule les animaux choisis pour le RNA-seq. X signifie que les échantillons ont été passés en RNAseq.

2.2 Analyses bioinformatiques

2.2.1 Exploration du jeu de données

Après l'extraction des ARNm et l'envoi des échantillons au laboratoire de l'unité à Montpellier, les échantillons ont été confiés à la plateforme MGX pour la réalisation des banques de préparation au séquençage et le séquençage proprement dit, sur Illumina HiSeq 2000. J'ai donc récupéré les fichiers issus du séquençage produits par la plateforme, avec les fichiers fastq et leurs rapports de contrôle qualité, qui était excellents (cf. Annexe 6).

Le séquençage des ARN messagers des cellules sanguines des bovins et des trypanosomes (présents dans le compartiment sanguin lors de l'infection) a produit entre 28 et 70 millions de reads pour les 120 échantillons de l'étude. Le mapping avec STAR a permis d'obtenir 97 % de reads alignés sur les génomes (NB : les banques qui ont partagé le même index que le contrôle interne d'Illumina ont automatiquement un taux d'alignement plus faible, de l'ordre de 83 %). Afin de valider l'alignement de ces séquences sur les génomes de référence du bovin et du trypanosome, nous avons d'abord vérifié le pourcentage de reads alignés de façon unique sur le génome bovin ou sur le génome du trypanosome. Les résultats du séquençage sont présentés dans la Figure 25.

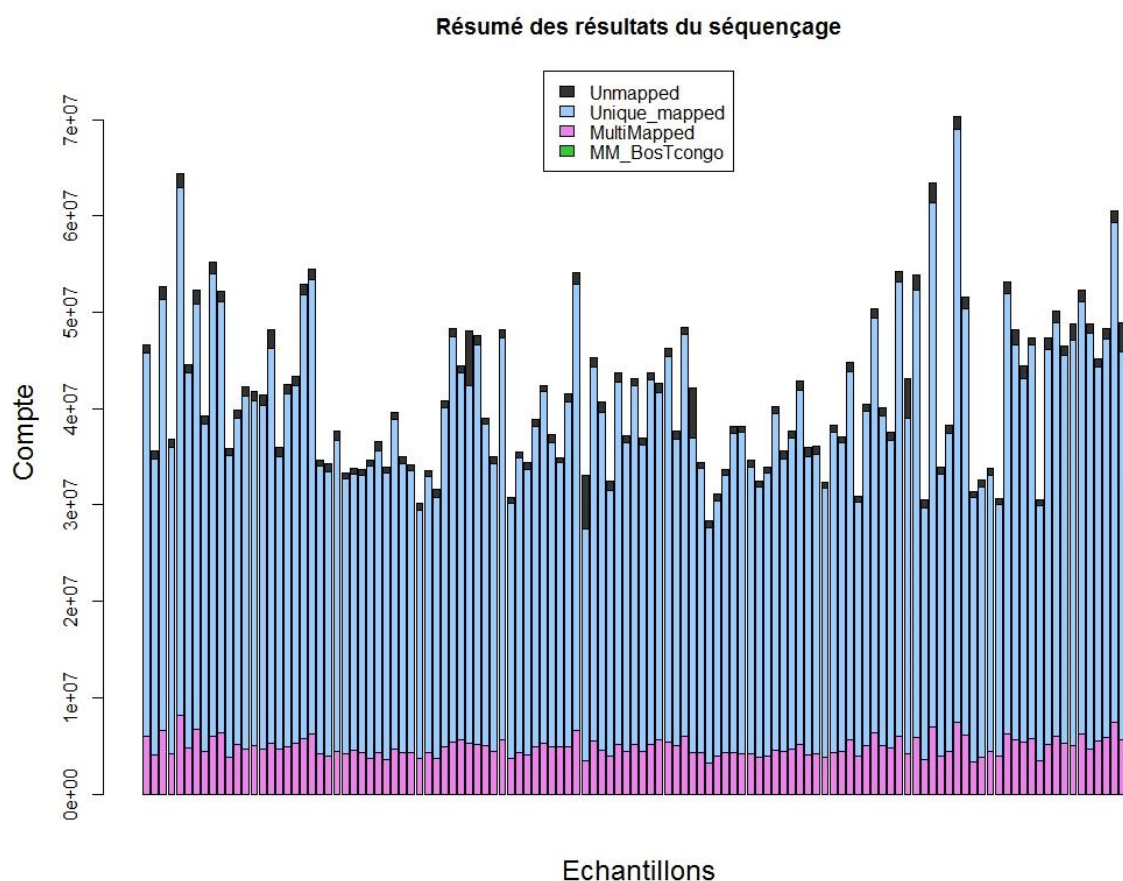


Figure 25 : Résumé des résultats de séquençage

L'axe des abscisses représente chaque échantillon (120 banques). L'axe des ordonnées le nombre de reads par échantillon. En bleu : les séquences alignées de manière unique sur l'un des génomes de référence (bovin ou trypanosome) (Uniq_map). En noir : les séquences qui ne s'alignent pas (Unmapped). En rose : les séquences qui s'alignent à plusieurs endroits sur le génome du bovin ou sur le génome du trypanosome (MultiMap). En vert : les séquences qui s'alignent à la fois sur le génome du bovin et du trypanosome (MM_BosTcongo).

On remarque qu'une grande majorité des séquences s'alignent de manière unique sur un seul génome de référence (86 % en moyenne). Un nombre important des reads était uniquement aligné sur le génome bovin (85 % en moyenne, de 73 à 88 %). Le pourcentage de reads alignés uniquement sur le génome du trypanosome a varié considérablement d'un échantillon à l'autre, allant de 4×10^{-6} à 2,72 %, avec une moyenne de 0,24 %. Cette variation observée montre la montée en puissance des trypanosomes au cours de l'infection, depuis les banques réalisées avant, en début et pendant la cinétique d'infection. La Figure 27 illustre ces résultats.

Bien que la majeure partie des reads s'alignent de manière unique, il existe néanmoins une proportion importante de reads qui s'alignent à plusieurs endroits sur l'un ou l'autre des génomes de référence ou même sur les deux (12 % en moyenne). On parle alors de multi alignement. Concernant les séquences qui se sont alignées à la fois sur le génome du bovin et sur le génome du trypanosome (voir Figure 26), il ne nous a pas été possible d'assigner l'organisme de référence.

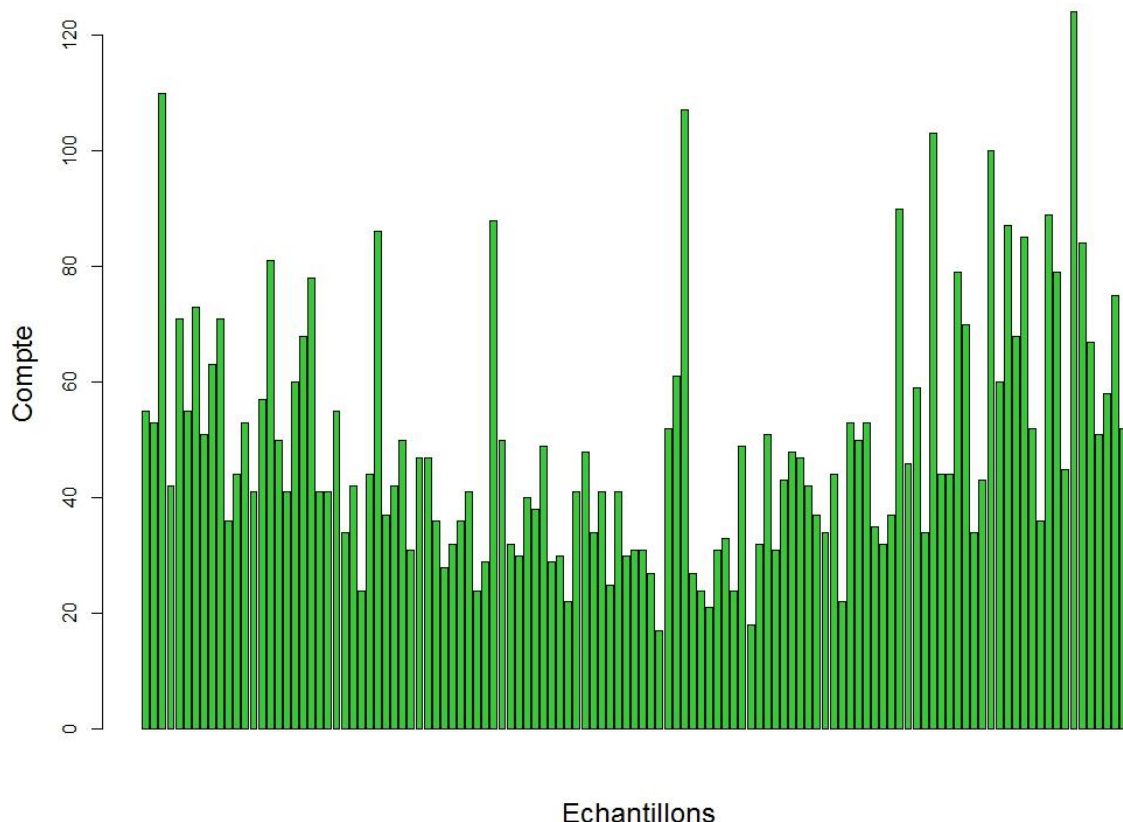


Figure 26 : Séquences alignées sur les génomes du bovin ET du trypanosome

L'axe des abscisses représente le nombre d'échantillons. L'axe des ordonnées le nombre de reads par échantillon.

Toutefois, la Figure 26 montre qu'on retrouve, par échantillon, au maximum 124 séquences qui sont alignées sur les 2 génomes à la fois. Ce nombre est donc négligeable en comparaison des millions de séquences obtenues par échantillon (28 à 70 millions suivant les banques). Nous montrons donc que la stratégie de mapping simultanée sur les génomes du bovin et du trypanosome permet bien de distinguer l'organisme d'origine des reads. Les reads à alignement multiple retrouvés dans nos résultats d'analyse sont essentiellement des reads qui s'alignent à plusieurs endroits sur le génome du bovin.

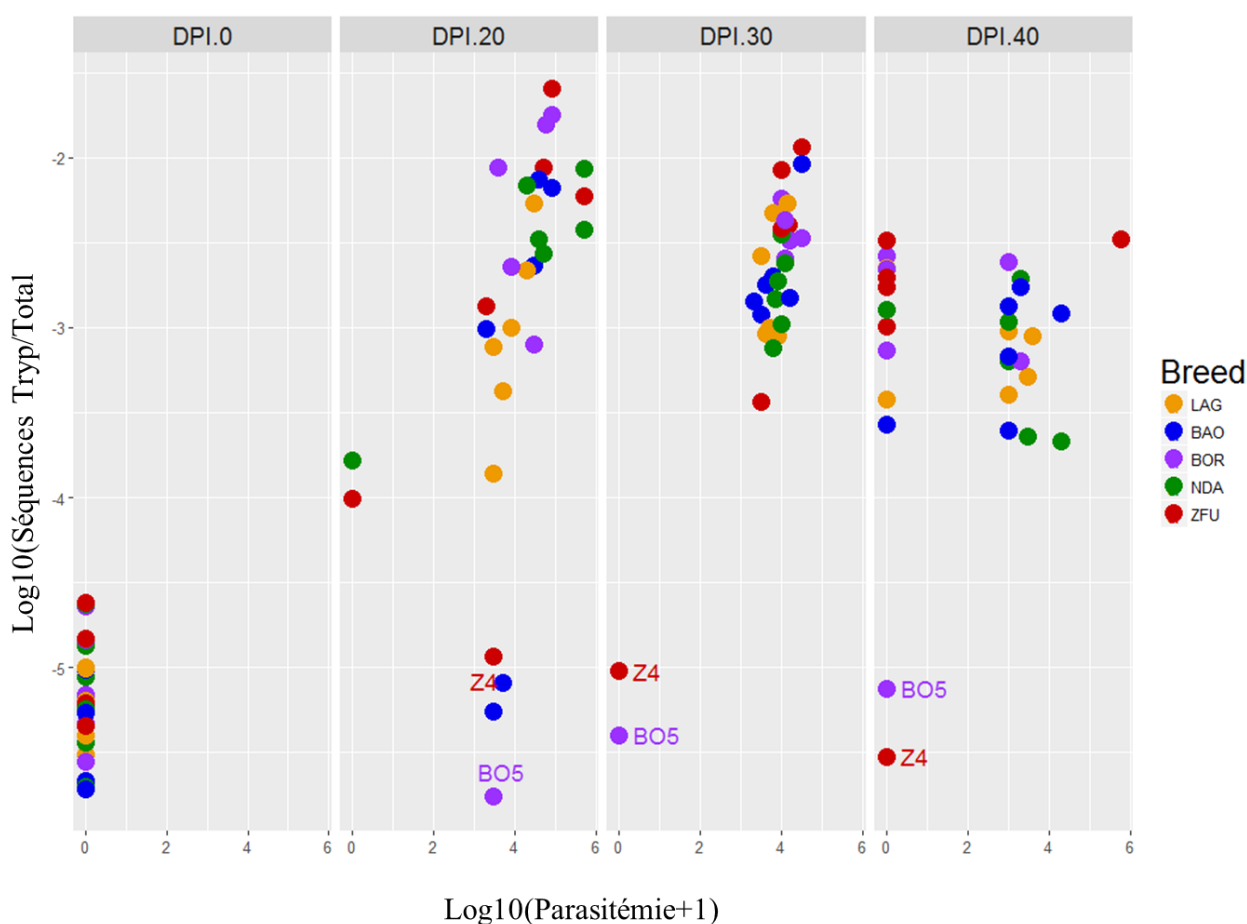


Figure 27 : Pourcentage de séquences associées au génome du trypanosome en fonction du temps et de la parasitémie

Les 4 panneaux verticaux représentent les 4 temps sélectionnés pour l'analyse RNA-seq (DPI : Day post infection), de gauche à droite DPI.0, DPI.20, DPI.30 et DPI.40 respectivement. L'axe des abscisses représente le log10 de la parasitémie (+1). L'axe des ordonnées représente le log10 du nombre de séquences attribuées au trypanosome sur le nombre total de séquences attribuées (bovin + trypanosome). En vert : échantillons de bovins de race Baoulé, en violet : Borgou, en rouge : Lagunaire, en bleu : N'Dama et en noir : Zébu.

En effet, avant l'infection (DPI.0), un nombre négligeable de reads s'est aligné sur le génome de *Trypanosoma congolense* : cela a correspondu à un ratio maximum de $3,8 * 10^{-5}$ reads (reads attribués de manière unique au génome du trypanosome/nombre de reads total), soit à 1589 reads maximum. Ce nombre négligeable de reads alignés sur le génome du parasite avant infection peut être assimilé à du bruit de fond, ce dernier étant très probablement issu de la technologie de séquençage et de l'algorithme intrinsèque au logiciel d'alignement utilisé. Au cours de l'infection (DPI.20, 30, 40), le nombre de reads attribués au génome du trypanosome a augmenté et a été étroitement lié à la dynamique d'infection (i.e. à la parasitémie).

Il est apparu, en outre, que certains individus n'ont pas présenté de parasitémie détectable (abscisse = 0) lors de l'infection (à DPI.20 et DPI.40). Cependant, nous avons observé, à ces dates-là, qu'un grand nombre de séquences (taux de l'ordre de 10^{-4} à 10^{-3}) étaient alignées sur le génome du trypanosome (exemple N8 à DPI.20). Nous avons donc été capables, grâce à la technique RNAseq utilisée, de détecter la présence du parasite chez les animaux infectés alors que cela n'avait pas été le cas lors du comptage des trypanosomes au microscope.

D'autre part, nous nous sommes aperçus que deux individus (BOR_5 et ZFU_4) ont eu des résultats tout à fait étonnants. Dans un premier temps, en effet, ils n'ont manifesté qu'une parasitémie transitoire et n'ont pas été anémiés (Berthier et al., 2015). Ensuite, selon les données RNAseq, à DPI.30 et DPI.40, le nombre de séquences attribuées au génome du trypanosome n'est pas apparu significatif chez ces 2 individus. Il semblerait donc, que chez ces animaux, l'infection ne se soit pas maintenue pour des raisons inconnues. Cet ensemble d'observations nous a amenés à ne pas intégrer ces deux individus (BOR_5 et ZFU_4) dans les analyses ultérieures. Un troisième animal a également été écarté. Il s'agit d'un Baoulé (BAO_3) qui était négatif au moment de l'achat mais qui s'était révélé positif en parasitémie à son arrivée au CIRDES, alors que tous les autres animaux avaient été détectés négatifs lors des tests de diagnostic (Berthier et al., 2015).

Initialement, nous avons donc 120 banques correspondant à 30 animaux mais suite à l'exploration des données, les analyses ont porté sur les 108 banques d'RNA-seq, correspondant à 27 animaux (5 BAO, 5 BOR, 6 LAG, 6 NDA et 5 ZFU) et quatre dates par animal (DPI.0, 20, 30 et 40).

2.3 Analyse du différentiel d'expression des gènes

Conformément aux premiers objectifs du projet, j'ai focalisé mes recherches sur l'analyse des données bovines.

Comme expliqué dans la partie Matériels et Méthodes, un premier tri a été effectué sur les gènes faiblement exprimés ou non exprimés. Parmi les 24 616 gènes annotés dans la base de données Ensembl 79, 13 107 gènes ont passé le filtre et ont formé la liste finale de gènes sur laquelle a porté la suite des analyses.

2.3.1 Observation globale des données

L'exploration globale des données d'expression a été réalisée avec EdgeR à l'aide de diagramme de dispersion sur les comptes normalisés des gènes.

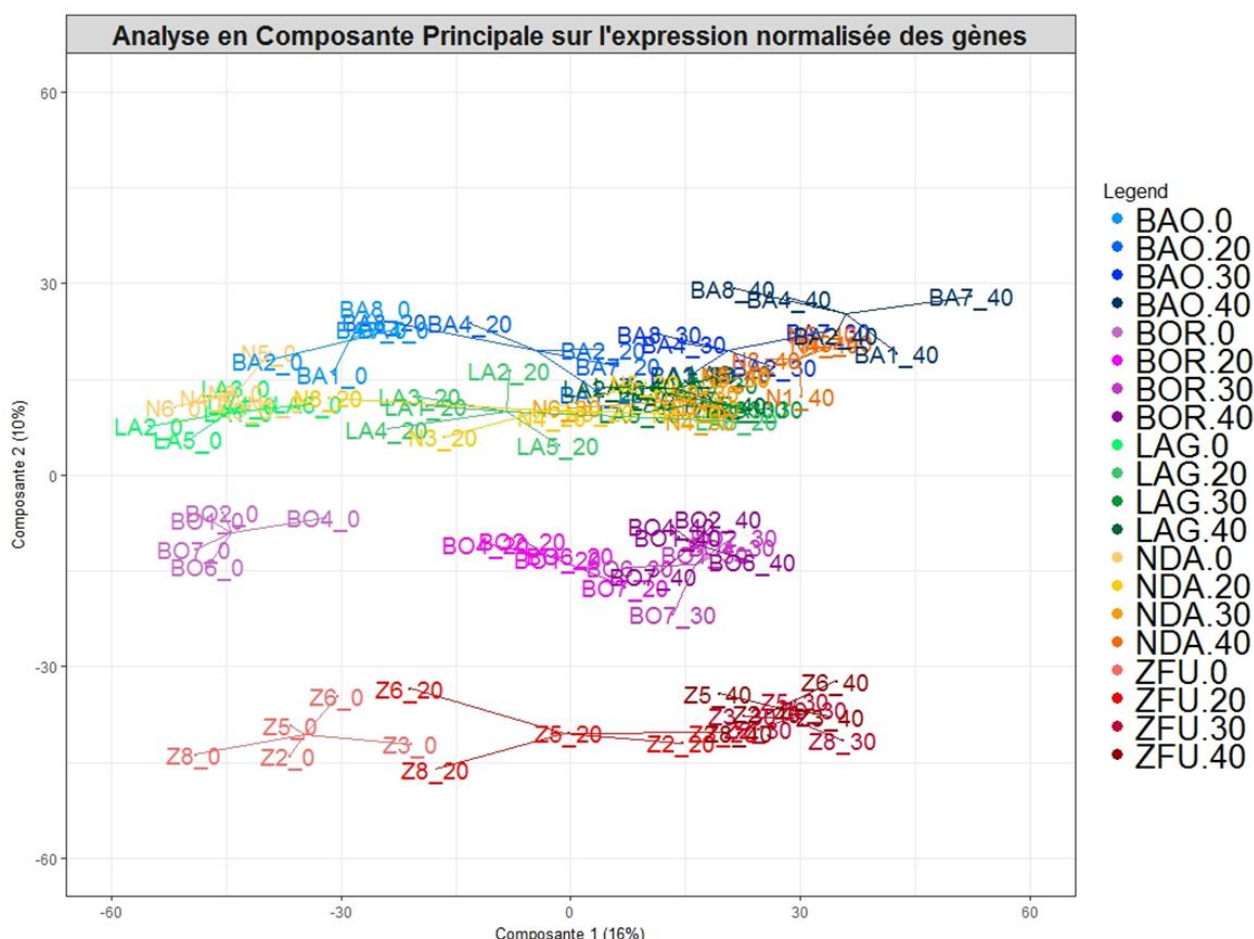


Figure 28 : Analyse multivariée des gènes différemment exprimés

Analyse en composante principale (ACP) sur l'expression normalisée des gènes. Chaque point correspond à un animal à un temps donné de l'infection. Chaque race est décrite par un gradient de couleur. En bleu : race de type Baoulé, en violet : Borgou, en vert : Lagunaire, en jaune : N'Dama et en rouge : Zébu. Chaque couleur varie sur un gradient de couleur allant du clair au foncé en fonction du temps de l'infection respectivement DPI.0 puis DPI.20 puis DPI.30 et DPI.40.

L'analyse du graphique permet tout d'abord de mettre en évidence que les deux premiers axes ont contribué respectivement à 16 % (axe 1) et 10 % (axe 2) de la variation totale, le premier axe d'explication de la variance est associé à l'infection et le second à un effet race.

Sur l'axe 1, les 108 banques s'organisent de la gauche vers la droite. On observe à gauche les comptes normalisés des gènes avant infection (DPI.0) puis on voit apparaître progressivement les 3 temps au cours de l'infection (DPI.20, 30, 40). L'axe 2, lié à l'effet race, s'organise en 3 niveaux : en bas, nous distinguons les données de comptage issues de la race ZFU (rouge), en

haut, celles qui sont issues des animaux de type taurin, représentées par les races NDA (jaune), BAO (bleu) et LAG (vert) et, au milieu, celles qui concernent la race métisse BOR (violet).

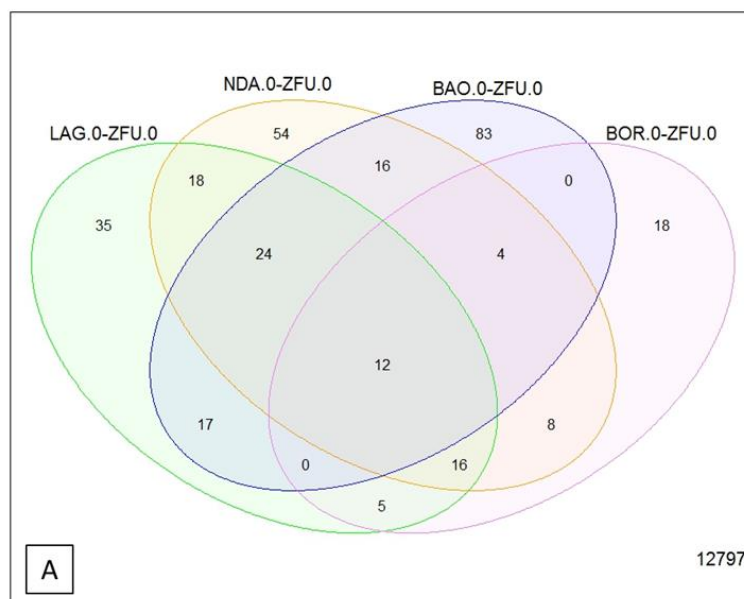
L'analyse de ces données montre également que les races taurines (AFT) et la race ZFU manifestent des différences basales (i.e. avant infection) révélées par leurs positions distinctes sur l'axe 2 de la Figure 28. Elle montre également que la réponse à l'infection de ces 5 races semble similaire puisqu'on observe qu'elles évoluent de façon quasiment parallèle au cours de l'infection.

2.3.2 Observations entre les races avant infection (à DPI.0)

Du fait que j'ai travaillé sur 19 contrastes (15 intra-races et 4 inter-races), un seuil strict correspondant à un $FDR < 0,001$ a été choisi pour désigner un gène D.E.

La comparaison des niveaux d'expression des gènes, avant infection, entre les races tolérantes/métisse (LAG, NDA, BAO, BOR) et la race sensible (ZFU) a permis d'identifier, au seuil choisi de FDR de 10^{-3} , respectivement 127, 152, 156 et 63 gènes qui ont été reportés comme différentiellement exprimés pour les 4 contrastes suivants : LAG.0-ZFU.0, NDA.0-ZFU.0, BAO.0-ZFU.0 et BOR.0-ZFU.0 (voir Figure 29 A et B).

Gènes DE uniques et communs entre les races avant infection



Gènes DE uniques et communs entre AFT et ZFU avant infection

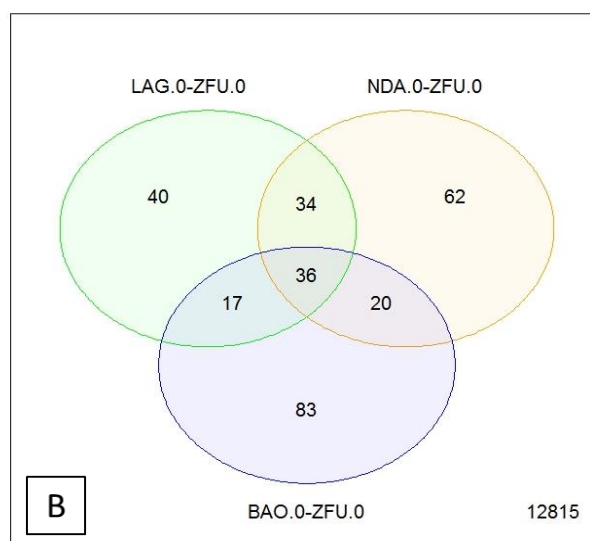


Figure 29 : Nombre de gènes dits différentiellement exprimés (DE) avant infection

A) entre les races bovines. B) entre les races tolérantes AFT et la race sensible ZFU. Chaque cercle coloré représente un contraste. L'intersection entre deux cercles représente le nombre de gènes DE partagés par les deux contrastes. Chaque chiffre correspond au nombre de gènes DE au sein de chaque contraste ou partagés par plusieurs contrastes. Le chiffre présent en bas à droite de chacun des diagrammes de Venn représente le nombre de gènes non DE au sein des 13 107 gènes, quelle que soit la condition.

A DPI.0, on observe que le nombre de gènes DE est plus faible entre la race sensible ZFU et la race métisse BOR qu'entre ZFU et les taurins AFT. Ce résultat était logiquement attendu en raison des résultats de l'ACP obtenus (voir axe 2 Figure 28). En effet, les races AFT étaient les plus éloignées de la race sensible ZFU et la race BOR métisse avait une position intermédiaire.

Au total, 310 gènes ont été retrouvés comme DE avant infection (12 797 non DE). Parmi les gènes DE, 12 gènes DE sont partagés par les 4 contrastes (voir Figure 29 A), 36 gènes DE sont partagés entre la race ZFU et les races taurins AFT et 70 sont partagés entre les contrastes LAG.0-ZFU.0 et NDA.0-ZFU.0 (voir Figure 29 B). Le **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** suivant regroupe, pour les 4 contrastes entre races à DPI.0, les détails sur les 12 gènes, leurs FDR et logFC associés.

Tableau 3 : Détails sur les 12 gènes DE, leurs FDR et logFC associés, pour les 4 contrastes entre races à DPI.0

ID Ensembl	Description	Gene Symbol	logFC	FDR	logFC	FDR	logFC	FDR	logFC	FDR
			LAG.0-ZFU.0	LAG.0-ZFU.0	NDA.0-ZFU.0	NDA.0-ZFU.0	BAO.0-ZFU.0	BAO.0-ZFU.0	BOR.0-ZFU.0	BOR.0-ZFU.0
ENSBTAG00000008936	ATP binding cassette subfamily C member 2	ABCC2	-7.76	2.11E-06	-7.72	2.27E-06	-8.85	7.58E-06	-6.68	2.47E-04
ENSBTAG00000017690	Carnosine synthase 1	CARNS1	1.43	2.88E-06	1.76	1.36E-09	1.35	3.24E-05	1.28	1.95E-04
ENSBTAG00000015991	cadherin 1	CDH1	2.55	7.28E-09	2.31	1.53E-07	1.92	5.85E-05	1.74	5.31E-04
ENSBTAG00000008654	hook microtubule tethering protein 2	HOOK2	1.15	2.88E-06	1.27	1.00E-07	1.11	2.08E-05	1.02	2.47E-04
ENSBTAG00000020892	interleukin 2 receptor subunit alpha	IL2RA	-1.06	9.85E-06	-1.30	1.34E-08	-0.98	1.93E-04	-1.22	3.72E-06
ENSBTAG00000033887	60S ribosomal protein L36a-like	LOC101906221	-4.37	3.49E-04	-5.41	1.57E-05	-4.48	8.02E-04	-4.82	6.63E-04
ENSBTAG00000038500	guanylate-binding protein 4-like	LOC783604	-0.68	3.18E-08	-0.63	4.35E-07	-0.65	2.05E-06	-0.53	2.47E-04
ENSBTAG00000005666	leucine rich repeat containing 20	LRRC20	2.25	4.76E-07	2.32	1.28E-07	2.17	3.93E-06	2.02	3.89E-05
ENSBTAG00000034366	regulator of G-protein signaling 2, 24kDa	RGS2	3.32	6.20E-06	2.48	8.69E-04	2.94	1.11E-04	3.30	3.32E-05
ENSBTAG00000017554	reticulon 4 interacting protein 1	RTN4IP1	-0.64	1.06E-05	-0.52	7.06E-04	-0.58	2.66E-04	-0.65	6.90E-05
ENSBTAG00000008609	septin 8	SEPT8	2.35	9.81E-11	2.46	1.73E-11	2.30	4.48E-09	2.11	9.83E-08
ENSBTAG00000022715			-4.65	1.85E-07	-3.26	3.10E-04	-3.31	6.34E-04	-4.13	5.06E-05

2.3.3 Observation au sein des races pendant l'infection (à DPI.20, 30, 40)

Nous nous sommes ensuite intéressés aux gènes DE au sein des races au cours de l'infection. L'analyse des 15 contrastes intra-races a permis d'identifier, au seuil choisi de $FDR < 0,001$, entre 41 et 3839 gènes comme étant exprimés de manière différentielle (DE) en fonction du contraste (voir Tableau 4 et

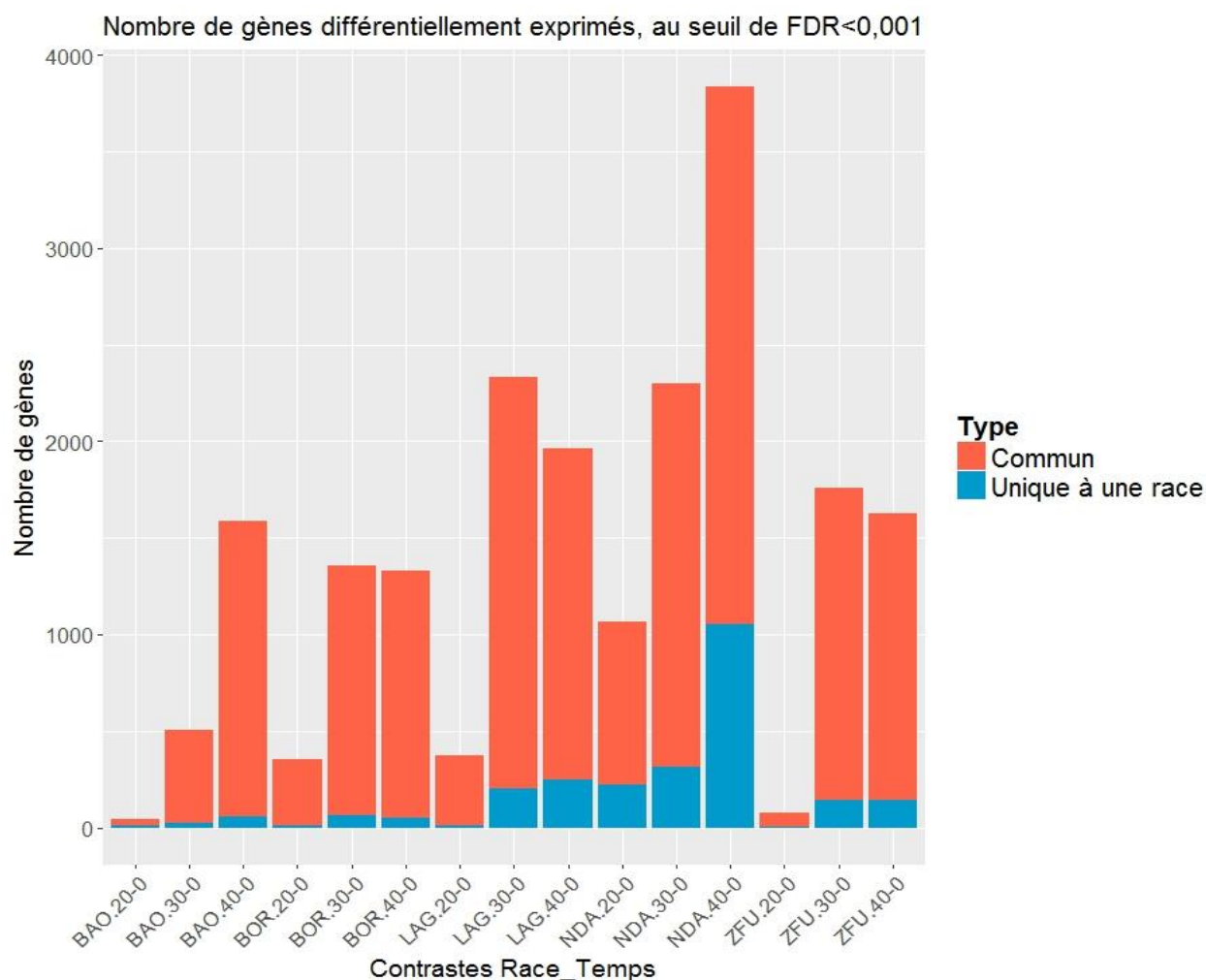


Figure 30).

Tableau 4 : Nombre de gènes DE au seuil de $FDR < 10^{-3}$, par race et par date

Contraste	NDA	LAG	ZFU	BAO	BOR
DPI.20-0	1067	370	77	41	351
DPI.30-0	2299	2330	1760	505	1353
DPI.40-0	3839	1966	1625	1584	1330
DPI (toutes les dates)	4344	2715	2141	1696	1753

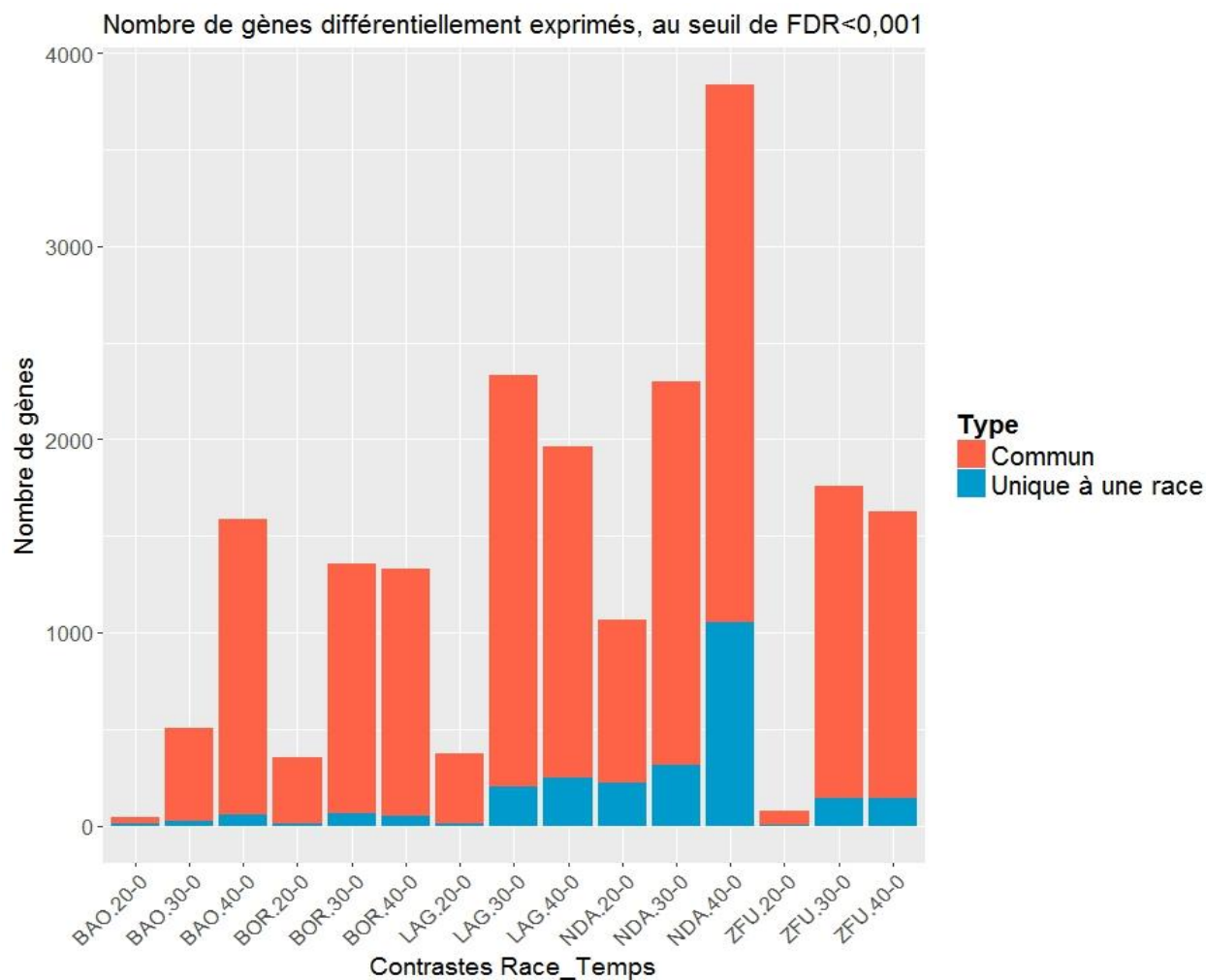


Figure 30 : Nombre de gènes différentiellement exprimés (DE) pour chaque contraste au seuil de FDR<0,001

L'axe des abscisses représente les 15 contrastes classés dans l'ordre suivant : Baoulé, Borgou, Lagunaire, N'Dama et Zébu Fulani. Pour chaque race, on retrouve 3 contrastes correspondant chacun à un différentiel de temps donné (respectivement DPI 20-0, 30-0, 40-0). L'axe des ordonnées représente le nombre de gènes DE au seuil choisi de FDR <0,001. La couleur rouge correspond aux gènes qui ont été DE dans au moins deux races, quelle que soit la date d'échantillonnage, et que nous avons nommés « communs ». La couleur bleue correspond aux gènes qui ont été DE au sein d'une race uniquement, et qui ont été dits « uniques ».

Lors de l'infection, et comme nous le supposions, le transcriptome bovin a été modifié de façon très significative chez toutes les races.

On observe, sur ce graphique, que de nombreux gènes DE sont communs entre les 5 races qu'elles soient trypanotolérantes (AFT), métisse (BOR) ou trypanosensible (ZFU) et que leur nombre est toujours supérieur au nombre de gènes DE uniques.

Lorsqu'on regarde l'évolution du nombre de gènes DE au cours du temps, on remarque que le nombre de gènes DE augmente pour toutes les races entre DPI.20-0 et DPI.30-0. Entre DPI.30-0 et DPI.40-0, il diminue légèrement pour les races BOR, LAG et ZFU mais, à l'inverse, il augmente pour les races BAO et NDA.

On note également que la race NDA a présenté, tout au long de l'infection, le plus grand nombre de gènes DE, sauf à DPI.30-0 où la race LAG en a eu plus (2330 gènes chez LAG.30-0).

Nous avons également vérifié le sens de variation des gènes DE en se basant sur les valeurs des LogFC. Cela nous a permis d'établir que les gènes DE, quelles que soient la race et les dates, ont varié de façon identique. Le logFC a toujours été soit positif (gène sur-exprimé), soit négatif (gène sous-exprimé). Seul le gène ENSBTAG00000014835 a fait exception. Au seuil de $FDR < 0,001$, ce dernier a présenté un logFC significativement positif pour le contraste LAG.40-0 ($\text{LogFC} = 3,70$, $FDR = 8.40E-04$) et significativement négatif pour le contraste BAO.40-0 ($\text{LogFC} = -5,02$, $FDR = 6.40E-05$).

La Figure 31 regroupe, sous la forme d'un diagramme de Venn, la totalité des gènes DE, uniques et partagés entre les 5 races bovines (tout temps confondus), soit 5270 gènes. Elle permet d'avoir une vision globale de notre jeu de données et montre également la difficulté qui réside dans la comparaison de listes de gènes DE partagés entre les différentes races, ou uniques à une race.

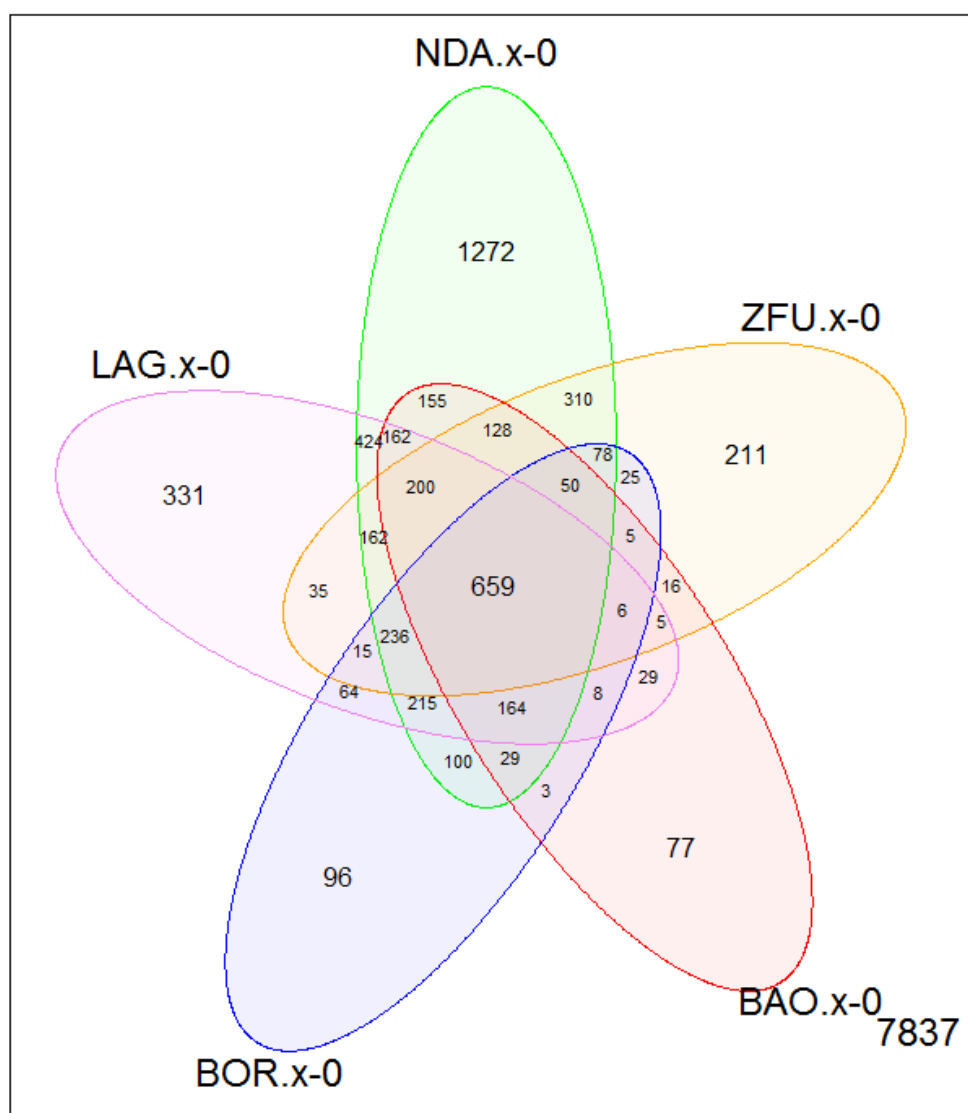


Figure 31 : Vue globale des 5270 gènes DE uniques et partagés entre les 5 races bovines (tous temps confondus)

Afin de mieux visualiser et appréhender les différences entre les 15 contrastes, nous avons généré une heatmap, construite sur les logFC des 5 270 gènes DE dans au moins un contraste. Cette méthode exploratoire est représentée par la Figure 32 suivante.

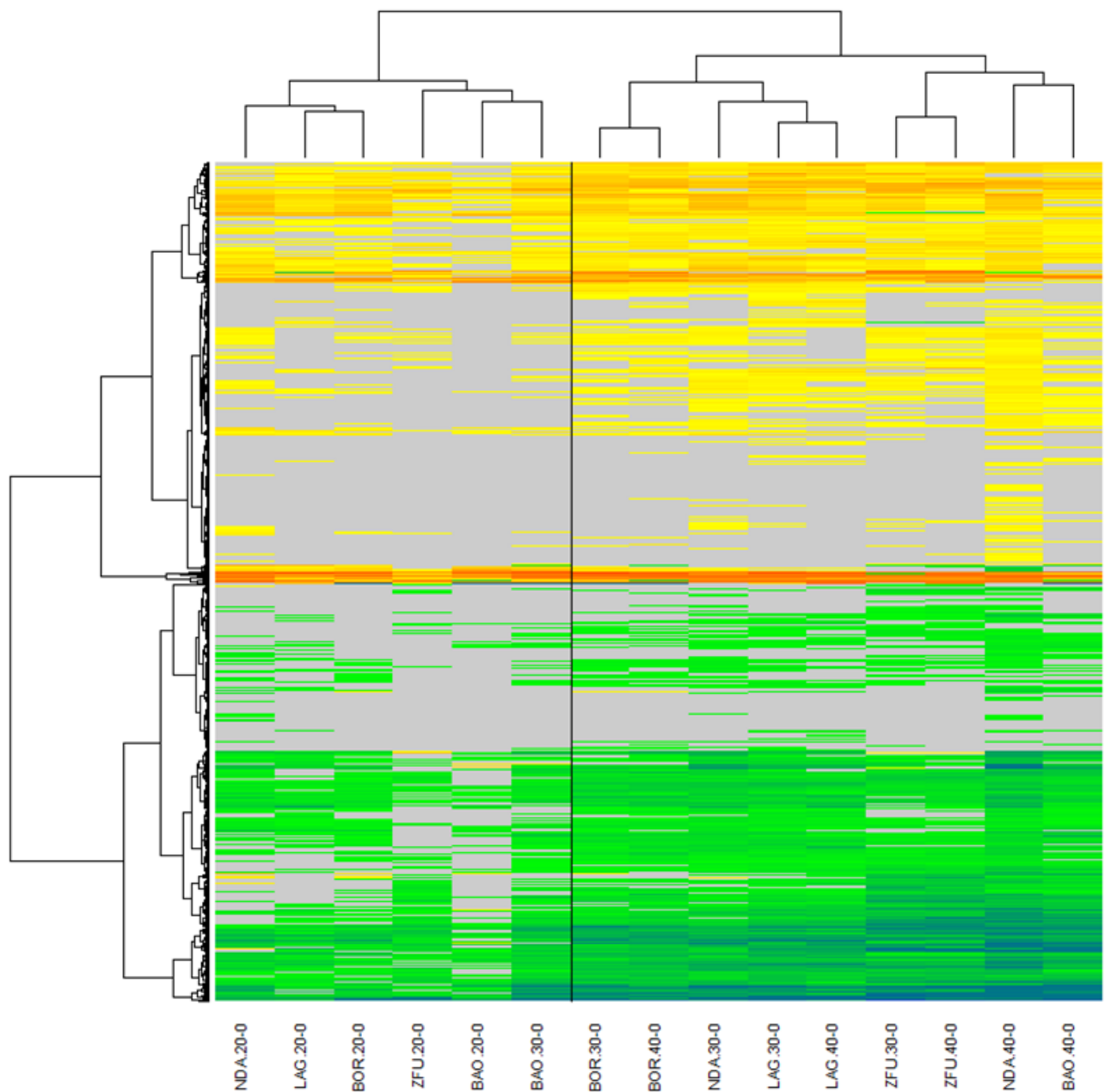


Figure 32 : HeatMap sur les logFC des gènes DE, dans au moins un contraste, au seuil de FDR de 10^{-3}

L'axe des abscisses représente les 15 contrastes et l'axe des ordonnées représente les gènes DE. Un logFC positif est coloré sur un gradient de couleur allant du jaune au rouge et un logFC négatif est coloré sur un gradient de couleur allant du vert au bleu. Les logFC compris entre -0,33 et 0,33 sont eux colorés en gris.

Cette représentation montre en premier lieu que les contrastes se sont regroupés principalement en fonction du temps de l'infection. A l'exception de BAO.30-0, on observe au niveau de la partie gauche de l'axe des abscisses, que les contrastes relatifs au début de l'infection (DPI.20-0) sont séparés des autres dates et ce, pour les 5 races. Ensuite, on remarque que plus on progresse au cours de l'infection (i.e. plus on se déplace vers la droite de l'axe des abscisses), plus les contrastes issus d'une même race ont tendance à se regrouper. C'est

notamment le cas pour les races BOR (BOR.30-0, BOR.40-0), LAG (LAG.30-0, LAG.40-0) et ZFU (ZFU.30-0, ZFU.40-0). On ne retrouve pas cependant le même schéma pour les races BAO et NDA. Cette visualisation de nos données n'a pas permis de mettre en évidence des différences franches dans les profils d'expression des gènes DE entre les races.

2.3.4 Focus sur les gènes les plus pertinents en termes de logFC

Six gènes ont été estimés comme significativement surexprimés ($\logFC > 0$) dans les 15 contrastes intra-race : NR4A1, CCL22, IFI30, CTSZ, KYNU, et IL17REL. Ces gènes sont principalement impliqués dans la réponse immunitaire notamment chez les macrophages et les cellules dendritiques. Le Tableau 5 regroupe les détails sur les 6 gènes DE communs pour les 15 contrastes.

Nous avons également identifié quels étaient les gènes DE possédant les logFC moyens les plus élevés. Ces gènes ne sont pas forcément significativement régulés chez toutes les races ou dans tous les contrastes. Les résultats sont présentés dans le Tableau 6.

Des gènes codant pour des sous-unités de l'hémoglobine (HBM logFC moyen le plus fort 6,96, HBA, HBB) et pour des protéines érythrocytaires (GYPB, ICAM4, SOX6) ont été mis en évidence. Plusieurs gènes impliqués dans la réponse immunitaire ont été identifiés et parmi eux, les gènes MARCO, CCL2, CSTB, IL6, MME, MAPK11, MAPK12 et MMP14. Le gène présentant le logFC moyen le plus élevé, après le gène codant pour l'hémoglobine, est celui qui code pour l'arginase (ARG1, logFC moyen de 6,90). En troisième position, on a trouvé un gène impliqué dans le fonctionnement cellulaire (REEP1, logFC moyen de 6,38).

Tableau 5 : Détails sur les 6 gènes DE dans les 15 contrastes intra-races

ID Ensembl	Description	Symbol	$-\log_{10}FDR_Mean$	logFC_Mean
ENSBTAG00000017718	C-C motif chemokine ligand 22	CCL22	8.2	5.68
ENSBTAG00000045808	interleukin 17 receptor E like	IL17REL	7.9	3.53
ENSBTAG00000000507	nuclear receptor subfamily 4 group A member 1	NR4A1	5.9	1.43
ENSBTAG00000032277	kynureninase	KYNU	11.7	1.09
ENSBTAG00000018349	IFI30, lysosomal thiol reductase	IFI30	14.2	1.01
ENSBTAG00000018784	cathepsin Z	CTSZ	8.7	0.92

ID Ensembl (Identifiant Ensembl), Description du gène, Symbole du gène, $-\log_{10}FDR_Mean$ (Moyenne sur le $-\log_{10}$ du FDR sur les 15 contrastes), logFC_Mean (moyenne du logFC)

Tableau 6 : Détails sur les gènes possédant les LogFC moyens les plus élevés

ID Ensembl	Description	Symbole	Contrastes Totaux	Contr. NDA	Contr. LAG	Contr. ZFU	Contr. BOR	Contr. BAO	-log10 FDR_Mean	logFC_Mean
ENSBTAG00000038757	hemoglobin subunit mu	HBM	11	3	3	1	3	1	5.7	6.96
ENSBTAG00000012403	arginase 1	ARG1	13	3	3	1	3	3	6.0	6.90
ENSBTAG00000004824	receptor accessory protein 1	REEP1	10	3	3	1	3	0	4.0	6.38
ENSBTAG00000017718	C-C motif chemokine ligand 22	CCL22	15	3	3	3	3	3	8.2	5.68
ENSBTAG00000018189	cystatin B (stefin B)	CSTB	11	3	2	0	3	3	4.5	4.91
ENSBTAG00000047331	glycophorin B	GYPB	7	3	0	1	3	0	3.7	4.76
ENSBTAG00000018473	macrophage receptor with collagenous structure	MARCO	9	2	2	0	3	2	3.6	4.16
ENSBTAG00000014365	adhesion G protein-coupled receptor E2-like		13	3	3	2	3	2	4.8	4.12
ENSBTAG00000026418	hemoglobin, alpha 2	HBA	2	0	1	0	1	0	1.8	4.10
ENSBTAG00000031845	protein SSX1-like		2	0	0	1	1	0	1.8	3.82
ENSBTAG00000026732	phospholipase A2 group IB	PLA2G1B	2	0	0	0	2	0	1.7	3.74
ENSBTAG00000045808	interleukin 17 receptor E like	IL17REL	15	3	3	3	3	3	7.9	3.53
ENSBTAG00000037811	chemokine (C-C motif) ligand 2	CCL2	3	0	2	0	1	0	2.2	3.52
ENSBTAG00000014921	interleukin 6	IL6	9	2	2	3	2	0	3.6	3.45
ENSBTAG00000038748	hemoglobin, beta	HBD	8	2	3	1	2	0	3.4	3.32
ENSBTAG00000022715	protein coding		11	3	3	0	3	2	4.4	3.31
ENSBTAG00000002075	membrane metalloendopeptidase	MME	14	3	3	3	3	2	6.4	3.26
ENSBTAG00000010314	intercellular adhesion molecule 4	ICAM4	4	0	1	1	2	0	1.8	3.16
ENSBTAG00000005471	Rh family C glycoprotein	RHCG	0	0	0	0	0	0	1.8	3.04
ENSBTAG00000044185	SRY-box 6	SOX6	4	0	2	0	2	0	2.1	3.02
ENSBTAG00000019574	mitogen-activated protein kinase 12	MAPK12	12	3	3	1	3	2	4.2	2.95
ENSBTAG00000014824	matrix metallopeptidase 14	MMP14	14	3	3	3	3	2	7.8	2.90
ENSBTAG00000030182	mitogen-activated protein kinase 11	MAPK11	13	3	3	2	3	2	4.5	2.86
ENSBTAG00000002779	gamma-aminobutyric acid type A receptor pi subunit	GABRP	1	0	1	0	0	0	1.9	2.83
ENSBTAG00000015745	RAB3A interacting protein like 1	RAB3IL1	5	1	0	2	2	0	2.8	2.79

ID Ensembl (Identifiant Ensembl), Description du gène, Symbole du gène, Contrastes totaux (nombre de contrastes intra-races où le gène est DE), Contrastes NDA à Contrastes BAO (nombre de contrastes par race où le gène est dit DE), -log10FDR_Mean (Moyenne sur le -log10 du FDR sur les 15 contrastes), logFC_Mean (moyenne du logFC)

2.3.5 Gènes DE dans les contrastes intra et inter races

Nous nous sommes ensuite intéressés aux gènes qui pourraient avoir des niveaux d'expression différents de façon basale (i.e. avant infection) et au cours de l'infection et qui pourraient, de ce fait, intervenir dans la capacité de réponse des animaux aux trypanosomes.

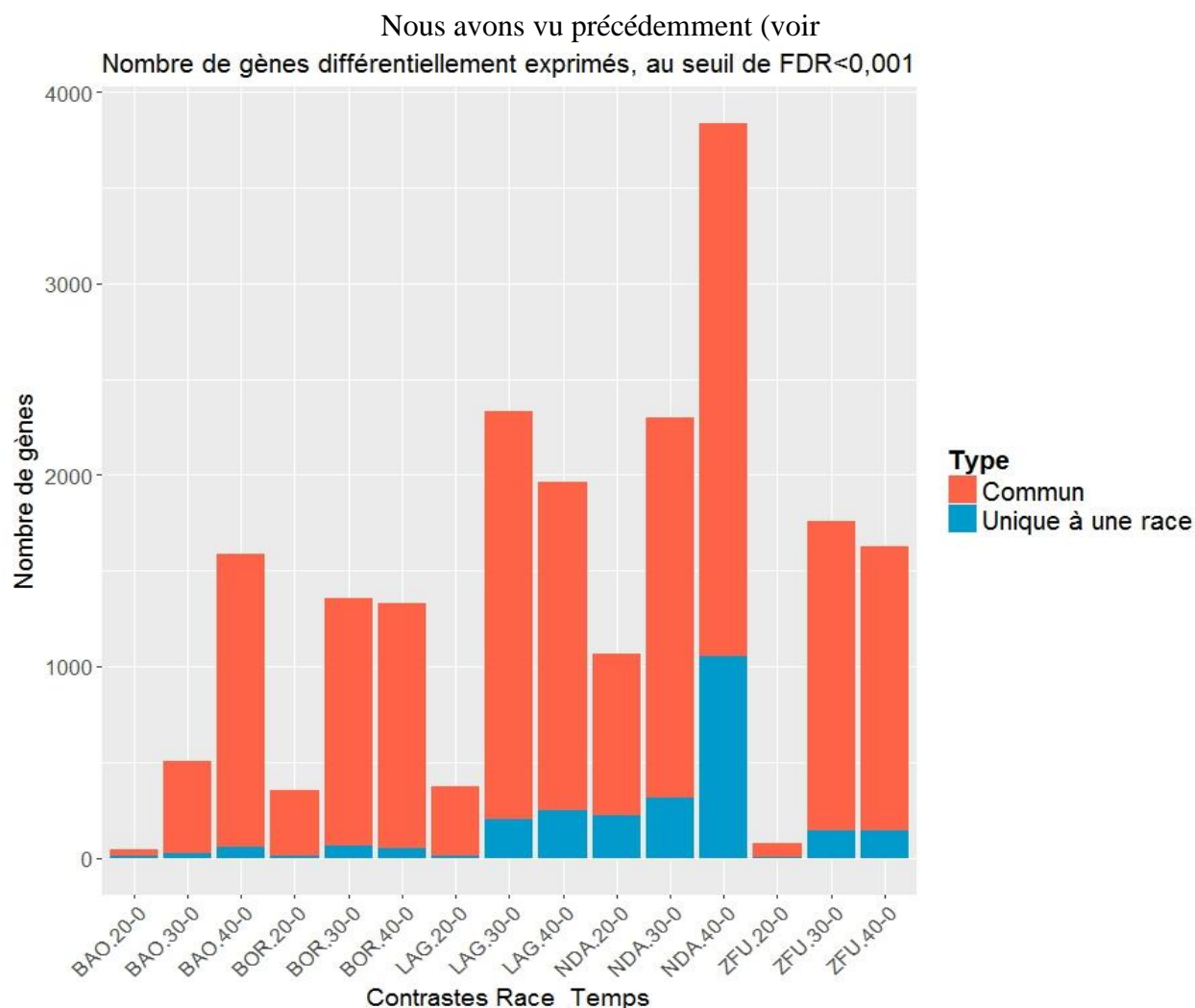


Figure 30) que la race trypanotolérante de référence NDA possédait le plus grand nombre de gènes DE au cours de l'infection. Nous avons donc choisi de comparer les données issues de cette race avec celles issues de la race trypanosensible de référence, la race ZFU. Nous avons analysé le contraste NDA.0-ZFU.0 puis nous l'avons comparé aux contrastes intra-races au cours du temps. Les résultats apparaissent dans la Figure 33.

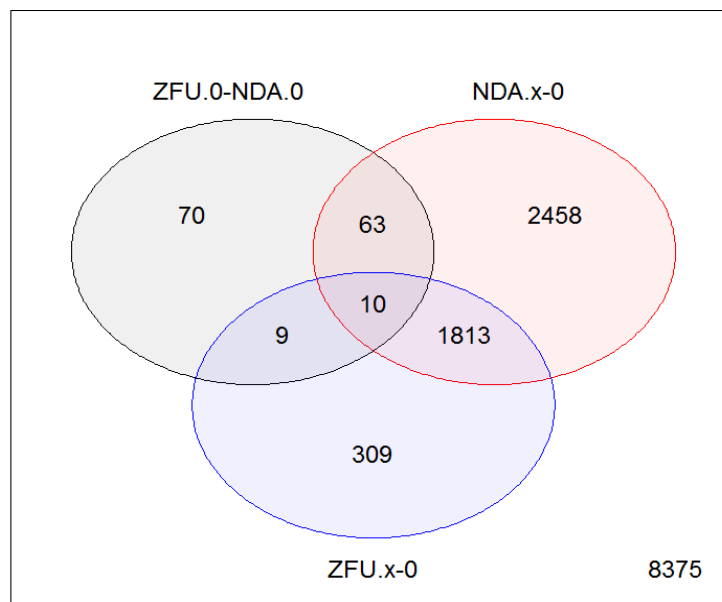


Figure 33 : Diagramme de Venn des gènes DE entre les races NDA et ZFU avant infection (ZFU.0-NDA.0) et DE chez la race NDA et/ou la race ZFU au cours de l'infection au seuil de $FDR < 0,001$ (notés NDA.x-0 et ZFU.x-0)

Avant infection, nous avons identifié 152 gènes DE entre ZFU et NDA (ZFU.0-NDA.0). Parmi ces gènes DE, 73 ont également été décrits comme DE au cours de l'infection chez la race NDA et 19 chez la race ZFU. Enfin, 10 gènes communs sont DE entre la condition ZFU.0-NDA.0 et les races NDA et ZFU au cours de l'infection.

Au total, 82 gènes sont décrits comme étant à la fois DE au cours de l'infection chez la race NDA et/ou chez la race ZFU et DE à la condition ZFU.0-NDA.0.

Nous avons alors construit une heatmap basée sur les logFC de ces 82 gènes en utilisant les contrastes intra-races (voir Figure 34).

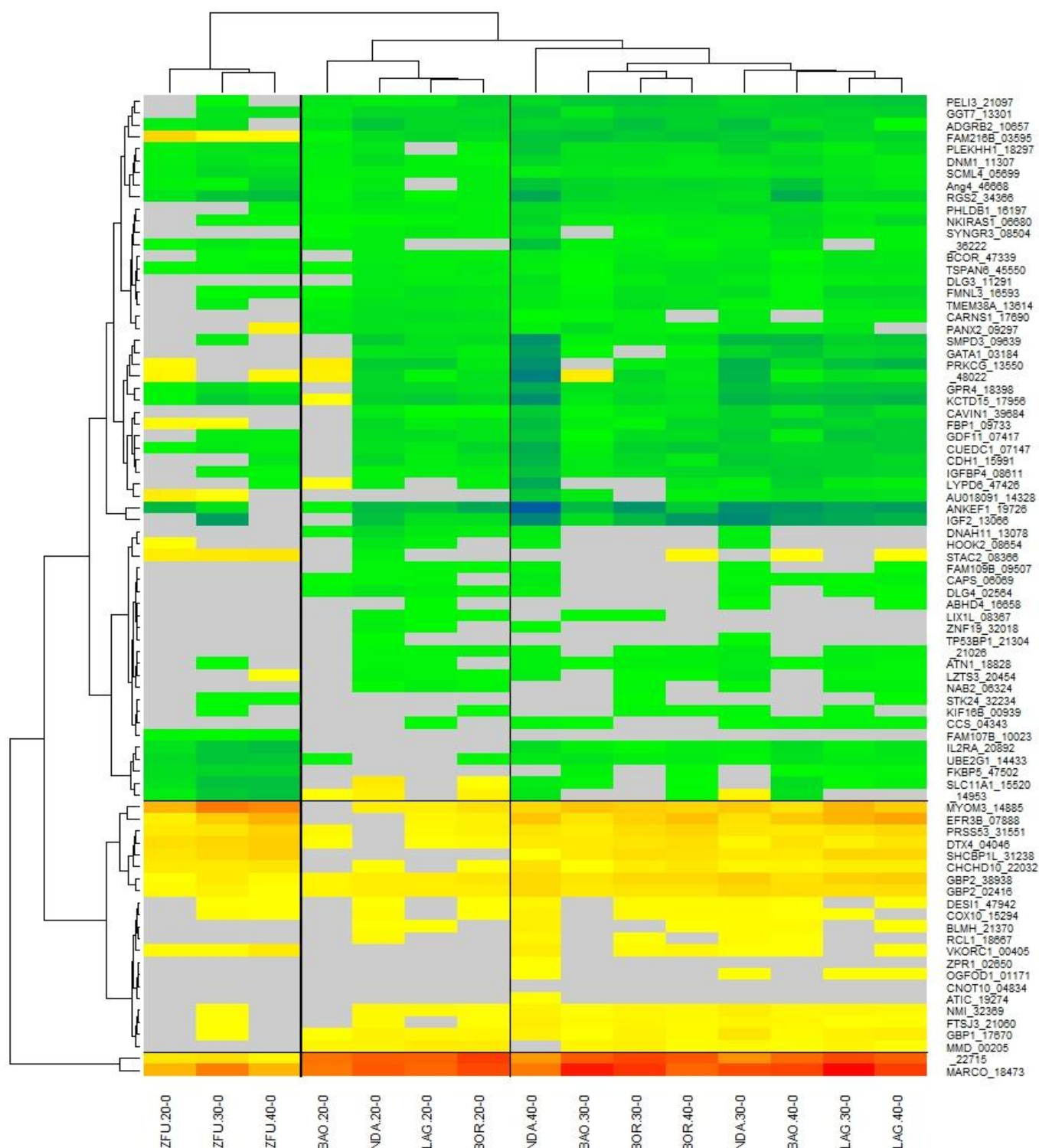


Figure 34 : Heatmap sur les logFC des gènes DE avant et au cours de l'infection entre les races NDA et ZFU au seuil de FDR <0,001

L'axe des abscisses représente les 15 contrastes intra-races et l'axe des ordonnées représente les 82 gènes DE. Un logFC positif est coloré sur un gradient de couleur allant du jaune au rouge et un logFC négatif est coloré sur un gradient de couleur allant du vert au bleu. Les logFC compris entre -0,25 et 0,25 sont eux colorés en gris.

On observe tout d'abord, au niveau de l'axe des abscisses, que les contrastes issus de la race ZFU sont regroupés et bien séparés des autres races. Le 2^e niveau de classification a ensuite

distingué les contrastes à DPI.20-0 des dates plus avancées dans l'infection (DPI.30- 0 et DPI.40- 0). La Figure 34 met également en évidence que 2 gènes, MARCO (récepteur des macrophages à structure collagène) et le gène ENSBTAG00000022715 (gène non annoté dans la base de données Ensembl), ont été particulièrement surexprimés.

La Figure 35 représente la dynamique, par contraste, de l'expression du gène MARCO. Au cours de l'infection, le gène MARCO a été significativement surexprimé chez toutes les races, mais pas de façon significative pour ZFU (en moyenne : $\text{LogFC} = 2,3$ et $\text{FDR} = 9,6 \times 10^{-2}$). A l'inverse, les gènes IGF2 (insulin like growth factor 2) et ANKEF1 (ankyrin repeat and EF-hand domain containing 1) ont été significativement sous-régulés chez toutes les races et particulièrement chez la race NDA.

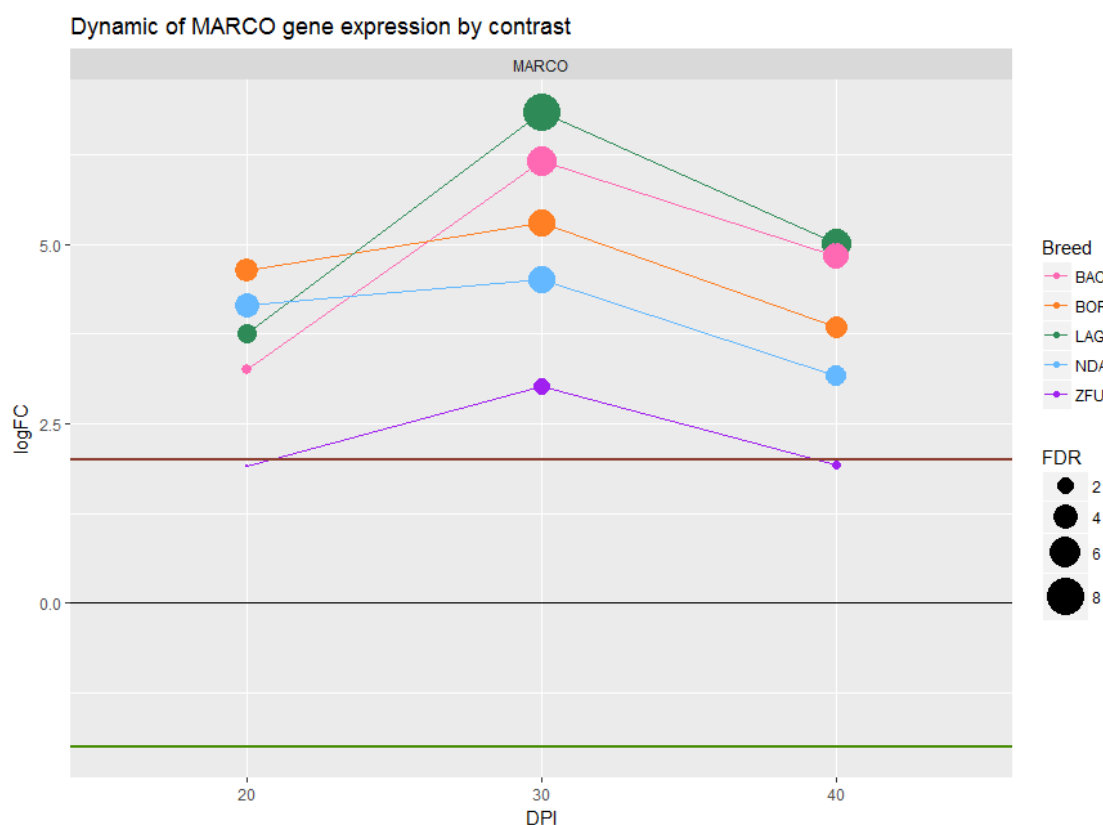


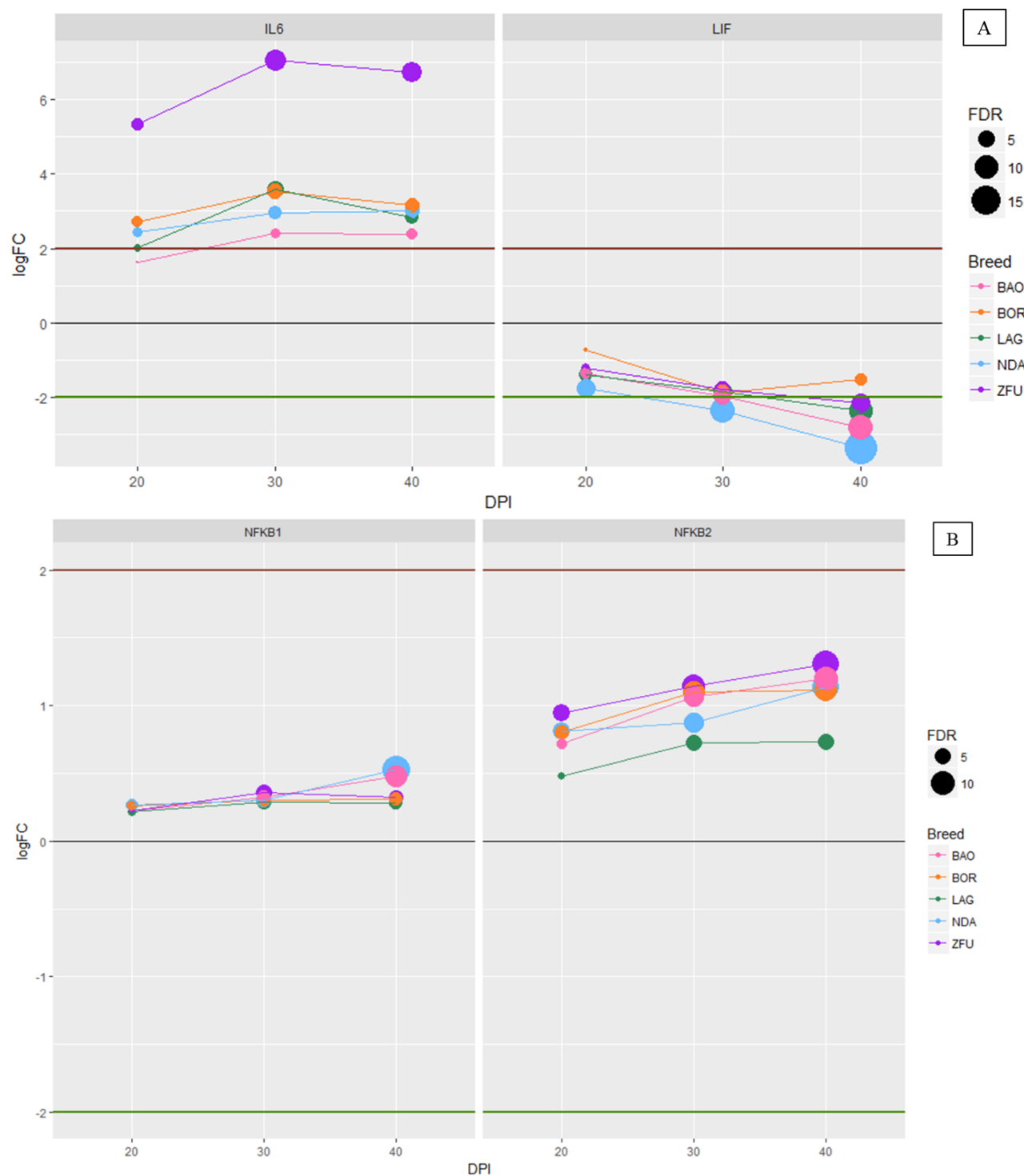
Figure 35 : Evolution du logFC du gène MARCO au sein des contrastes intra-races

L'axe des abscisses représente le temps de l'infection (DPI, avec le logFC mesuré par rapport au DPI.0), l'axe des ordonnées le logFC. Chaque race est décrite par une couleur. En rose : race de type Baoulé, en orange : Borgou, en vert : Lagunaire, en bleu : N'dama et en violet : Zébu. La taille du cercle est proportionnelle à la valeur de $-\log_{10}(\text{FDR})$: plus le cercle est grand, plus le FDR est significatif.

2.3.6 Focus sur des cytokines et des marqueurs cellulaires

Nous avons également regardé si certains gènes, mis en évidence précédemment dans d'autres études ((O'Gorman et al., 2006), (O'Gorman et al., 2009)) et codant pour des molécules

clés de l'immunité telles que des cytokines, leurs récepteurs ou encore des marqueurs cellulaires, présentaient des changements d'expression au cours de l'infection.



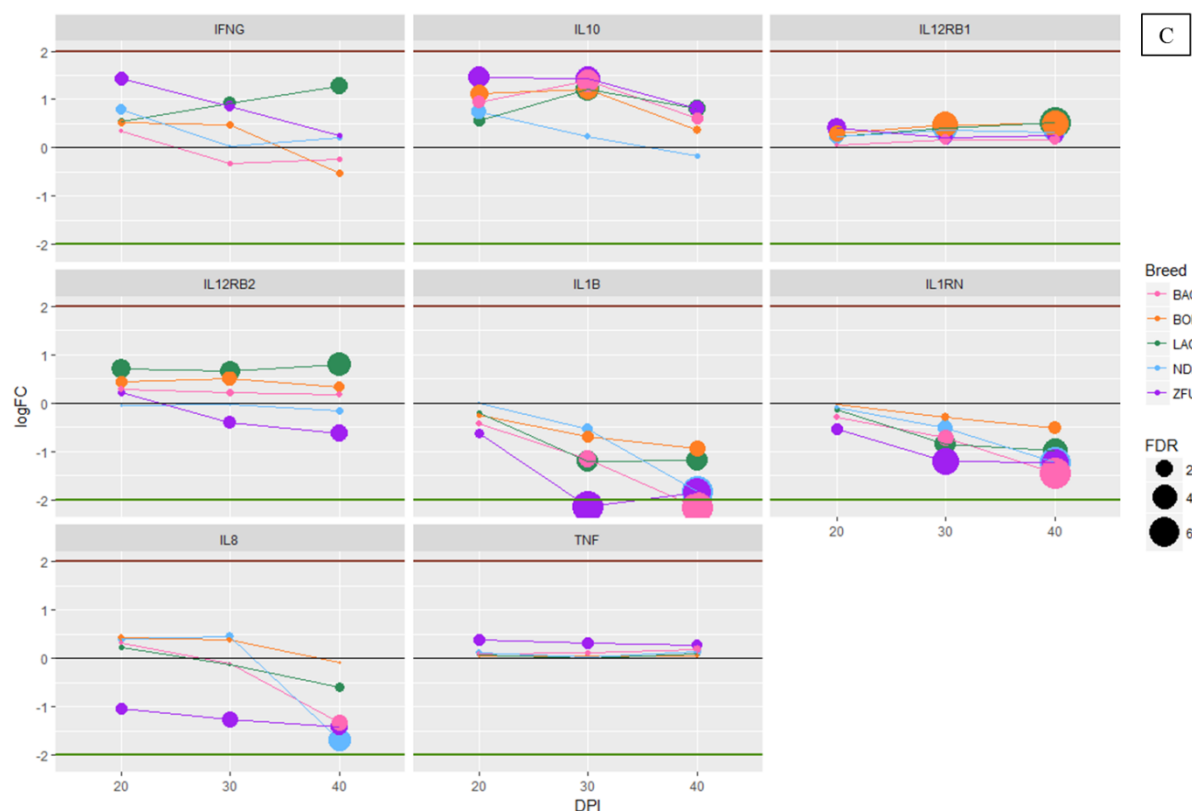


Figure 36 : Evolution du logFC des gènes codant des cytokines, des récepteurs de cytokines et des régulateurs de transcription (NFKB) par contraste intra-race

L'axe des abscisses représente le temps de l'infection (DPI, avec le logFC mesuré par rapport au DPI.0), l'axe des ordonnées le logFC. Chaque race est décrite par une couleur. En rose : race de type Baoulé, en orange : Borgou, en vert : Lagunaire, en bleu : N'Dama et en violet : Zébu. La taille du cercle est proportionnelle à la valeur de $-\log_{10}(\text{FDR})$: plus le cercle est grand, plus le FDR est significatif.

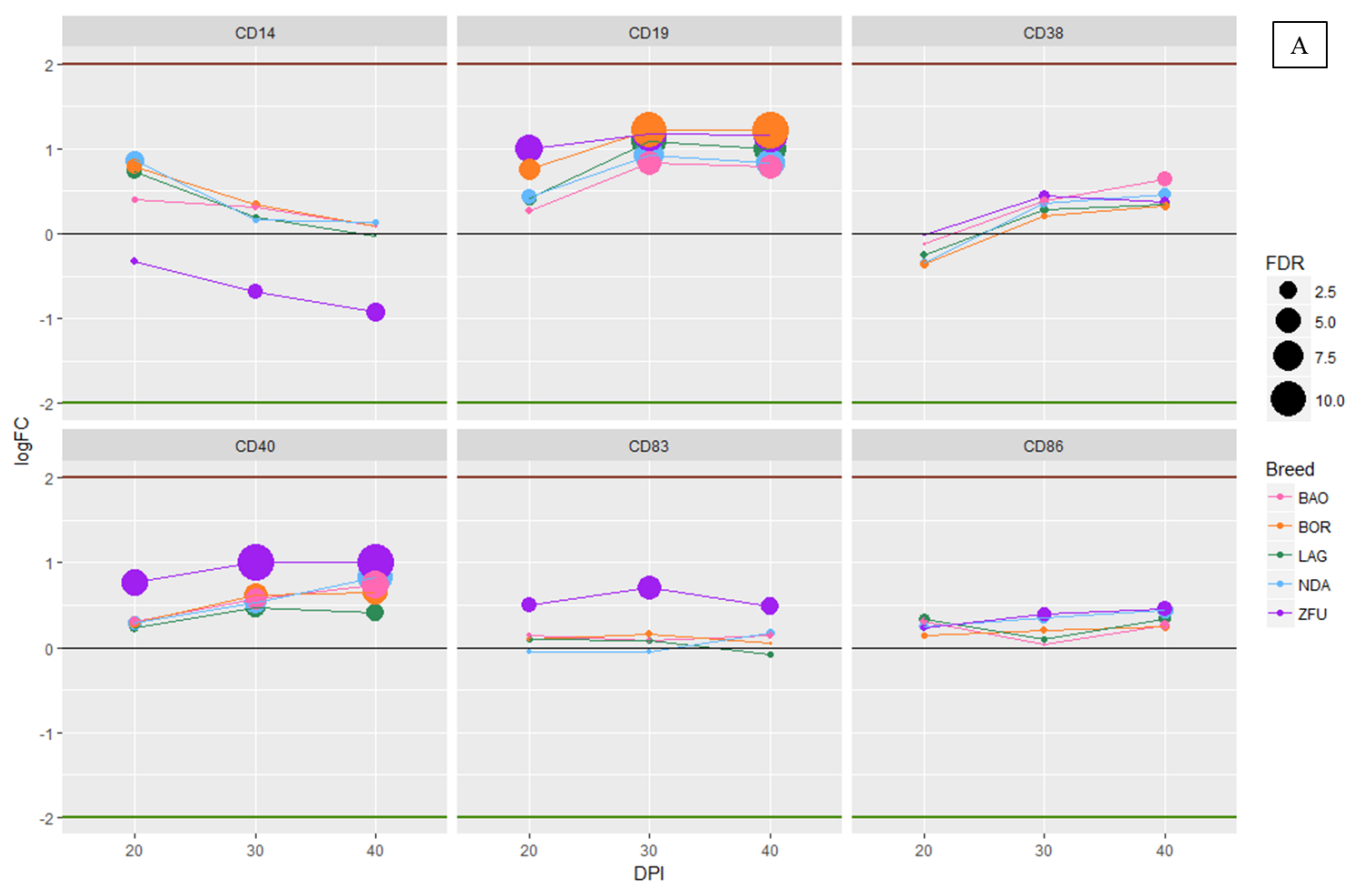
Parmi les gènes DE identifiés dans nos données, l'IL6 a été significativement sur-régulée chez toutes les races (sauf BAO) et de façon très importante chez ZFU (en moyenne $\log\text{FC} = 6,38$ et $-\log_{10}(\text{FDR}) = 6,28$) (voir Figure 36 A) (pareillement à (O'Gorman et al., 2006)). LIF, qui est régulé de façon opposé à l'IL6 (Metcalf, 2011), a été significativement sous-exprimé dans toutes les races. NFKB1 et NFKB2 ont été également sur-régulés de façon significative chez toutes les races (voir Figure 36 B).

A l'inverse, l'IL8 (syn. CXCL8) a été sous-régulée chez ZFU (en moyenne $\log\text{FC} = -1,24$ et $-\log_{10}(\text{FDR}) = 1,48$) mais n'est significativement sous-exprimée que chez la NDA à DPI40 ($\log\text{FC} = -1.70$, $\text{FDR} = 4 \times 10^{-4}$). L'IL1B et IL1RN ont été significativement sous-régulés pour toutes les races sauf pour BOR et LAG pour l'IL1B (voir Figure 36 C). L'IL10 a été sur-régulée de façon significative chez ZFU à DPI20 et DPI30 mais n'apparaît pas de manière significative chez NDA ni BOR. IL12RB1 est légèrement surexprimé et significatif chez NDA, LAG, BOR. IL12RB2 est significativement surexprimé chez LAG.

L'INFG et le TNF, qui ont été observés comme surexprimés à certaines dates de l'infection par (O'Gorman et al., 2006), n'ont pas été différentiellement exprimés dans nos données. Nous n'avons pas détecté de séquences correspondant à certains gènes reportés dans la bibliographie, par exemple ceux codant l'IL2 ou l'IL4.

A noter que TICAM1 et ARHGAP15, proposés en gènes candidats par (Noyes et al., 2011), ne sont pas différentiellement exprimés.

Nous avons ensuite regardé les gènes DE relatifs à des marqueurs cellulaires de type CD (cluster ou classe de différenciation), qui sont plus ou moins spécifiques à certains types cellulaires.



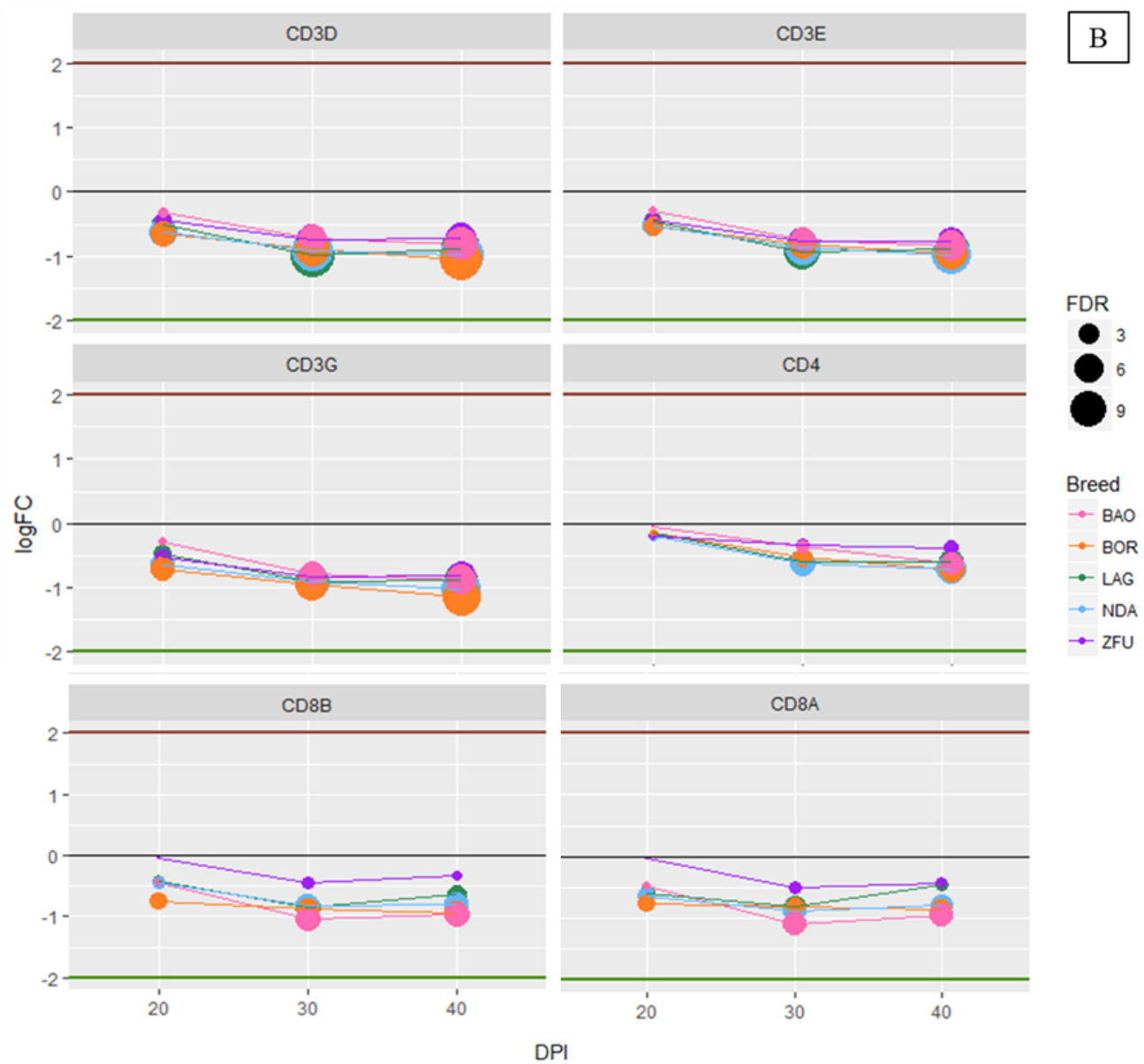


Figure 37 : Dynamique de l'expression des gènes de CD par contraste

Nous remarquons que le CD19 (un marqueur de lymphocyte B) a été surrégulé de façon très significative chez toutes les races. C'est aussi le cas du CD40 (un marqueur de LB mais aussi d'autres cellules) qui est significativement surrégulé pour toutes les races à partir de DPI30 et de manière précoce et très significative pour ZFU (en moyenne $\logFC = 0,93$ et $-\log_{10}(FDR) = 9,16$) (voir Figure 37 A). CD83 (cellules dendritiques, LB, cellules de Langerhans) a été DE à ZFU.30-0. CD14, un marqueur des monocytes et des macrophages, n'a pas été différentiellement régulé, tout comme CD38 (différents précurseurs hématopoïétiques) et CD86 (majoritairement macrophages, mais aussi monocytes, cellules dendritiques et LT).

Inversement, CD3D, CD3E, CD3G, qui rentrent dans la composition des récepteurs des lymphocytes T (TCR), ont été sous-régulés de façon significative pour toutes les races. CD4 (corécepteur des cellules T restreintes au CMH de classe II), CD8A et CD8B (corécepteurs des

cellules T restreintes au CMH de classe I) ont été également significativement sous-régulés à partir de DPI30 avec, cependant, de la variabilité entre races (CD4 significatif chez NDA, LAG et BOR ; CD8A pour NDA et BAO ; CD8B pour NDA, LAG, BOR et BAO). Nous n'avons pas observé pas de valeurs significatives pour ZFU (voir Figure 37 B).

L'analyse du différentiel d'expression des gènes, à partir de données RNA-seq, a permis de d'obtenir des listes de gènes DE au sein des différents contrastes décrits précédemment. Ces listes contiennent un nombre extrêmement important de gènes, ce qui ne permet pas une analyse manuelle de leur fonction ni de leurs interactions. Afin d'identifier et caractériser les fonctions biologiques, les voies de signalisation et les réseaux fonctionnels associés à ces gènes DE, nous avons utilisé le logiciel Ingenuity Pathway Analysis (IPA[®]).

2.4 Interprétation biologique

2.4.1 Analyse fonctionnelle des gènes DE entre les races avant infection

Les 4 contrastes (LAG.0-ZFU.0, NDA.0-ZFU.0, BAO.0-ZFU.0 et BOR.0-ZFU.0) établis précédemment ont permis d'identifier les gènes DE entre les races avant infection. C'est sur ces contrastes qu'a porté, en premier lieu, l'analyse fonctionnelle réalisé avec IPA[®], afin d'identifier les fonctions biologiques et les maladies (DisFun), les voies canoniques (CanPath) et les molécules régulatrices en amont de nos gènes (régulateurs en amont, UpStream), enrichis en gènes différentiellement exprimés. Un seuil de p-value < 0,001 a été choisi pour considérer un résultat comme significatif, avec au moins trois gènes DE impliqués dans la fonction ou la voie biologique décrite. Les résultats, issus de cette première analyse, sont détaillés dans les tableaux suivants.

Functions	-log10(Pval) LAG.0-ZFU.0	-log10(Pval) NDA.0-ZFU.0	-log10(Pval) BAO.0-ZFU.0	-log10(Pval) BOR.0-ZFU.0	Zscore LAG.0-ZFU.0	Zscore NDA.0-ZFU.0	Zscore BAO.0-ZFU.0	Zscore BOR.0-ZFU.0
Organization of plasma membrane	3.1	0.0	3.8	0.0	NA	0.0	NA	0.0
Lobular breast adenocarcinoma	0.0	3.4	0.0	3.4	0.0	NA	0.0	NA
Stage IIIA cancer	3.6	1.5	0.0	0.0	NA	NA	0.0	0.0
Abnormal morphology of body wall	0.0	1.4	0.0	3.6	0.0	NA	0.0	NA
Eosinophilia of esophagus	0.0	0.0	1.4	3.5	0.0	0.0	NA	NA
Relapsed unresectable renal cancer	3.2	0.0	1.7	0.0	NA	0.0	NA	0.0
Stage 4 unresectable renal cancer	3.2	0.0	1.7	0.0	NA	0.0	NA	0.0
Abnormality of large intestine	0.0	0.0	0.0	4.9	0.0	0.0	0.0	NA
Resectable secondary tumor	3.1	0.0	1.7	0.0	NA	0.0	NA	0.0
Inflammation of liver	0.0	0.0	0.0	4.5	0.0	0.0	0.0	-0.6
Ulcerative colitis	0.0	0.0	0.0	4.4	0.0	0.0	0.0	NA
Colitis	0.0	0.0	0.0	4.4	0.0	0.0	0.0	NA
Synthesis of leukotriene C4	0.0	0.0	0.0	4.2	0.0	0.0	0.0	NA
Diarrhea	0.0	0.0	0.0	4.1	0.0	0.0	0.0	NA
Drug-refractory irritable behavior	0.0	0.0	4.0	0.0	0.0	0.0	NA	0.0
Myoclonic dystonia	0.0	0.0	4.0	0.0	0.0	0.0	NA	0.0
Replication of cells	0.0	0.0	0.0	3.9	0.0	0.0	0.0	NA
Spinocerebellar ataxia type 2	0.0	0.0	3.8	0.0	0.0	0.0	NA	0.0
Non-alcoholic liver disease	0.0	0.0	0.0	3.8	0.0	0.0	0.0	NA
Cervical spondylotic myelopathy	0.0	0.0	3.7	0.0	0.0	0.0	NA	0.0
Inflammatory Bowel Disease	0.0	0.0	0.0	3.7	0.0	0.0	0.0	NA
Complex partial seizure	0.0	0.0	3.6	0.0	0.0	0.0	NA	0.0
Asthma	0.0	0.0	0.0	3.5	0.0	0.0	0.0	NA
Biphasic malignant pleural mesothelioma	3.5	0.0	0.0	0.0	NA	0.0	0.0	0.0
Epithelioid malignant pleural mesothelioma	3.5	0.0	0.0	0.0	NA	0.0	0.0	0.0
Inflammation of body cavity	0.0	0.0	0.0	3.4	0.0	0.0	0.0	0.0
Bleeding of lung	0.0	0.0	0.0	3.4	0.0	0.0	0.0	NA
Dysplasia	0.0	0.0	0.0	3.3	0.0	0.0	0.0	NA
Area of atherosclerotic lesion	0.0	3.3	0.0	0.0	0.0	NA	0.0	0.0
Volume of blood cells	0.0	3.3	0.0	0.0	0.0	NA	0.0	0.0
Actinic keratosis	0.0	0.0	0.0	3.2	0.0	0.0	0.0	NA
Viral hepatitis	0.0	0.0	0.0	3.2	0.0	0.0	0.0	NA
Contraction of cardiac muscle	0.0	0.0	3.2	0.0	0.0	0.0	NA	0.0
Fragile X syndrome	0.0	0.0	3.2	0.0	0.0	0.0	NA	0.0
Transport of peptide	0.0	3.2	0.0	0.0	0.0	NA	0.0	0.0
Function of respiratory system	0.0	0.0	0.0	3.1	0.0	0.0	0.0	NA
Alcohol abuse	0.0	0.0	3.1	0.0	0.0	0.0	NA	0.0
Multiple system atrophy	0.0	0.0	3.1	0.0	0.0	0.0	NA	0.0
Organization of organelle	0.0	0.0	3.1	0.0	0.0	0.0	NA	0.0
Head and neck adenocarcinoma	3.1	0.0	0.0	0.0	NA	0.0	0.0	0.0
Morphogenesis of eye	0.0	0.0	0.0	3.0	0.0	0.0	0.0	NA
Chronic hepatitis	0.0	0.0	0.0	3.0	0.0	0.0	0.0	NA
Volume of cells	0.0	0.0	0.0	3.0	0.0	0.0	0.0	NA

Tableau 7 : « Diseases and functions » identifiées lors de l'analyse fonctionnelle des gènes DE entre les races avant infection au seuil de p-value < 0,001

(Fonctions : fonctions biologiques proposées par IPA, suivies par les $-\log_{10}$ des p-values estimées dans 4 contrastes inter-races à DPI.0, et les z-scores estimés dans ces mêmes contrastes)

UpStream	-log10(Pval) LAG.0-ZFU.0	-log10(Pval) NDA.0-ZFU.0	-log10(Pval) BAO.0-ZFU.0	-log10(Pval) BOR.0-ZFU.0	Zscore LAG.0-ZFU.0	Zscore NDA.0-ZFU.0	Zscore BAO.0-ZFU.0	Zscore BOR.0-ZFU.0
BSG	4.5	2.9	4.2	4.0	0.9	NA	0.9	NA
HDAC3	2.1	1.9	NA	5.7	NA	NA	NA	NA
AKT1	2.3	1.4	1.4	3.7	0.0	-0.8	NA	-0.6
NR1I2	2.4	2.2	NA	3.6	0.8	0.2	NA	-0.2
LIF	2.7	2.4	NA	3.0	0.9	NA	NA	NA
chenodeoxycholic acid	2.8	1.5	NA	3.7	NA	NA	NA	NA
beta-estradiol	2.3	NA	NA	5.6	1.0	NA	NA	-0.3
PTHLH	1.6	2.6	NA	3.7	NA	NA	NA	NA
IL1B	2.4	1.8	NA	3.3	-0.3	-1.6	NA	0.0
FOXA2	2.0	NA	NA	5.5	NA	NA	NA	0.0
STAT3	1.5	NA	NA	5.6	0.4	NA	NA	-0.1
CDC73	NA	3.7	NA	3.0	NA	NA	NA	NA
CD3 group	2.2	NA	NA	4.4	NA	NA	NA	-0.8
CD46	3.7	NA	NA	2.8	NA	NA	NA	NA
Vegf	1.1	1.2	NA	4.0	2.4	1.9	NA	2.2
prostaglandin E2	1.8	NA	NA	4.0	1.4	NA	NA	1.6
IL4	NA	0.4	NA	5.3	NA	-2.1	NA	0.0
INS	2.2	NA	NA	3.3	1.6	NA	NA	1.6
IL10RA	NA	0.8	NA	4.7	NA	2.0	NA	1.9
TNF	1.4	NA	NA	4.1	-0.8	NA	NA	-0.1
ABCA1	1.7	NA	NA	3.8	NA	NA	NA	NA
BTK	1.5	NA	NA	3.5	NA	NA	NA	NA
NR0B2	1.5	NA	NA	3.5	NA	NA	NA	NA
IL2	NA	1.7	NA	3.3	NA	-0.5	NA	-0.3
TGFB1	1.6	NA	NA	3.3	0.7	NA	NA	1.4
IL6	1.4	NA	NA	3.6	1.5	NA	NA	0.9
SNAI2	3.1	NA	1.7	NA	NA	NA	NA	NA
ATF3	NA	NA	NA	4.6	NA	NA	NA	0.4
IFNG	NA	NA	NA	4.6	NA	NA	NA	0.3
ALOX15	NA	NA	NA	4.2	NA	NA	NA	NA
HGF	0.8	NA	NA	3.4	2.0	NA	NA	1.7
progesterone	NA	NA	NA	4.2	NA	NA	NA	1.2
Immunoglobulin	NA	NA	NA	4.1	NA	NA	NA	-0.1
AHR	NA	NA	NA	3.8	NA	NA	NA	-0.1
IL3	NA	NA	NA	3.8	NA	NA	NA	0.4
JAK3	NA	NA	NA	3.7	NA	NA	NA	NA
AGT	NA	NA	NA	3.6	NA	NA	NA	0.6
IL15	NA	0.3	NA	3.3	NA	-2.0	NA	-1.5
MYC	NA	NA	NA	3.6	NA	NA	NA	1.2
SOX4	3.2	NA	NA	NA	0.0	NA	NA	NA
STAT1	NA	NA	NA	3.1	NA	NA	NA	0.6
TWIST1	3.1	NA	NA	NA	-0.3	NA	NA	NA
SMARCB1	NA	NA	NA	3.0	NA	NA	NA	NA

Tableau 8 : « Upstream Regulators » identifiés lors de l'analyse fonctionnelle des gènes DE entre les races avant infection au seuil de p-value <0,001

(UpStream : molécules régulatrices en amont proposées par IPA, suivies par les -log10 des p-values estimées dans 4 contrastes inter-races à DPI.0, et les z-scores estimés dans ces mêmes contrastes)

L'analyse fonctionnelle des gènes DE entre les races avant infection a mis en évidence trois observations majeures.

Aucune voie métabolique ni aucune voie de signalisation (CanPath) n'a été trouvée significativement enrichie en gènes DE. Nous avons identifié un total de 43 fonctions biologiques « Diseases and Functions » (DisFun) et 43 régulateurs « Upstream Regulators » (UpStream) considérés comme significatifs au seuil de $p\text{-value} < 0,001$.

Les contrastes LAG.0-ZFU.0, NDA.0-ZFU.0, BAO.0-ZFU.0 et BOR.0-ZFU.0 ont regroupé respectivement 8, 4, 11 et 22 DisFun (Tableau 7). Deux DisFun (« Organisation de la membrane plasmique » et « Adénocarcinome du sein lobulaire ») sont partagées respectivement par les contrastes LAG.0-ZFU.0 et BAO.0-ZFU.0 et par les contrastes NDA.0-ZFU.0 et BOR.0-ZFU.0.

Parmi les 43 UpStream considérés comme significatifs, les contrastes LAG.0-ZFU.0, NDA.0-ZFU.0, BAO.0-ZFU.0 et BOR.0-ZFU.0 ont regroupé respectivement 5, 1, 1 et 38 UpStream (Tableau 8). Un seul UpStream (BSG) est partagé par trois contrastes : LAG.0-ZFU.0, BAO.0-ZFU.0 et BOR.0-ZFU.0.

2.4.2 Analyse fonctionnelle des gènes DE au sein des races pendant l'infection

Afin de déterminer, au cours de l'infection, les fonctions biologiques associées aux gènes DE, l'analyse fonctionnelle a concerné, à ce stade, les gènes DE issus des 15 contrastes intra-races.

2.4.2.1 Diseases and Functions (DisFun)

La table de sortie des DisFun a comporté 2653 lignes, correspondant chacune à une maladie ou fonction biologique, dont la $p\text{-value}$ a été inférieure à 0,05 dans au moins l'un des 15 contrastes intra-race, correspondant à une $p\text{-value}$ corrigée, calculée par IPA avec la méthode de Benjamini-Hochberg (B-H), de 0,23 (NB : la correction de B-H est pratiquée par IPA au sein d'un contraste). La $p\text{-value}$ maximale a été de 10^{-21} , correspond à une B-H value de 10^{-17} .

Nous avons choisi de placer le seuil d'une DisFun à une B-H value $< 0,001$ dans au moins un contraste, pour considérer cette DisFun comme significativement enrichie. A ce seuil, nous avons identifié de 642 fonctions biologiques.

Le **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** répertorie les DisFun les plus importantes, découvertes lors de l'analyse fonctionnelle. Celles-ci sont classées en fonctions des valeurs de $p\text{-value}$ corrigées selon la procédure de Benjamini-Hochberg.

Tableau 9 : Top 5 des DisFun obtenues lors de l'analyse fonctionnelle des gènes DE au sein des races au cours de l'infection

Catégorie	Fonction biologique	Contraste	Z-score	B- H value
Cancer	Metastatic solid tumor	BAO.20-0	NA	6.E-04
Cellular Movement	Leukocyte migration	BAO.30-0	-1.54	2.E-08
Cellular Movement	Cell movement of lymphatic system cells	BAO.30-0	-2.17	2.E-08
Cellular Movement	Migration of cells	BAO.30-0	-0.90	2.E-08
Cellular Movement	Cell movement of mononuclear leukocytes	BAO.30-0	-1.95	2.E-08
Cellular Movement	Cell movement of lymphocytes	BAO.30-0	-2.35	2.E-08
Cellular Development	Proliferation of lymphocytes	BAO.40-0	0.14	2.E-14
Cellular Growth and Proliferation	Proliferation of lymphatic system cells	BAO.40-0	0.02	2.E-14
Cellular Development	Proliferation of immune cells	BAO.40-0	0.23	2.E-14
Cellular Development	Proliferation of blood cells	BAO.40-0	0.23	5.E-14
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	Activation of cells	BAO.40-0	-2.76	4.E-13
Cell Cycle	Segregation of chromosomes	BOR.20-0	1.33	5.E-07
Cell Cycle	Mitosis	BOR.20-0	1.54	5.E-07
Cancer	Thoracic neoplasm	BOR.20-0	1.31	1.E-06
Cell Cycle	Cell cycle progression	BOR.20-0	0.80	1.E-06
Cancer	Lung tumor	BOR.20-0	1.31	2.E-06
Cellular Development	Proliferation of mononuclear leukocytes	BOR.30-0	-0.63	2.E-08
Cellular Development	Proliferation of lymphocytes	BOR.30-0	-0.61	2.E-08
Cellular Development	Proliferation of immune cells	BOR.30-0	-0.23	2.E-08
Cellular Development	Proliferation of blood cells	BOR.30-0	-0.20	2.E-08
Cellular Growth and Proliferation	Proliferation of lymphatic system cells	BOR.30-0	-0.34	1.E-07
Cellular Development	Proliferation of mononuclear leukocytes	BOR.40-0	-0.73	1.E-17
Cellular Development	Proliferation of lymphocytes	BOR.40-0	-0.72	1.E-17
Cellular Development	Proliferation of immune cells	BOR.40-0	-0.43	1.E-17
Cellular Development	Lymphopoiesis	BOR.40-0	-2.59	4.E-17
Cellular Development	Proliferation of blood cells	BOR.40-0	-0.90	9.E-17
Hematological System Development and Function	Quantity of leukocytes	LAG.30-0	-1.21	1.E-12
Cellular Development	Proliferation of lymphocytes	LAG.30-0	-0.14	1.E-12
Cellular Development	Proliferation of blood cells	LAG.30-0	-0.41	1.E-12
Cellular Development	Lymphopoiesis	LAG.30-0	-2.08	1.E-12
Cellular Development	Proliferation of mononuclear leukocytes	LAG.30-0	-0.12	3.E-12
Cellular Development	Proliferation of mononuclear leukocytes	LAG.40-0	-0.12	2.E-14
Cellular Development	Proliferation of lymphocytes	LAG.40-0	0.01	2.E-14
Cellular Development	Proliferation of immune cells	LAG.40-0	-0.11	2.E-14
Cellular Development	Proliferation of blood cells	LAG.40-0	-0.61	2.E-14
Cellular Growth and Proliferation	Proliferation of lymphatic system cells	LAG.40-0	-0.30	2.E-13

Catégorie	Fonction biologique	Contraste	Z-score	B- H value
Cell Cycle	Segregation of chromosomes	NDA.20-0	2.02	1.E-11
Cell Cycle	Cell cycle progression	NDA.20-0	1.93	1.E-11
Cell Cycle	Mitosis	NDA.20-0	1.38	6.E-09
Cancer	Female genital tract cancer	NDA.20-0	NA	6.E-09
Cancer	Hepatocellular carcinoma	NDA.20-0	0.74	1.E-08
Cell Cycle	Cell cycle progression	NDA.30-0	0.17	6.E-08
Cell Cycle	Segregation of chromosomes	NDA.30-0	1.50	3.E-07
Cellular Development	Proliferation of immune cells	NDA.30-0	-0.90	2.E-06
Cellular Development	Proliferation of blood cells	NDA.30-0	-1.19	3.E-06
Cellular Movement	Cell movement of lymphatic system cells	NDA.30-0	-3.42	6.E-06
Cellular Development	Proliferation of lymphocytes	NDA.40-0	-0.75	2.E-06
Cellular Growth and Proliferation	Proliferation of lymphatic system cells	NDA.40-0	-1.08	2.E-06
Cellular Development	Proliferation of immune cells	NDA.40-0	-0.61	2.E-06
Cellular Development	Proliferation of blood cells	NDA.40-0	-1.05	2.E-06
Cellular Development	Lymphopoiesis	NDA.40-0	-3.79	2.E-06
Lipid Metabolism	Synthesis of sterol	ZFU.20-0	1.70	1.E-12
Lipid Metabolism	Steroid metabolism	ZFU.20-0	2.60	1.E-12
Lipid Metabolism	Metabolism of cholesterol	ZFU.20-0	2.22	3.E-11
Lipid Metabolism	Synthesis of terpenoid	ZFU.20-0	2.00	8.E-11
Lipid Metabolism	Synthesis of cholesterol	ZFU.20-0	2.22	1.E-10
Hematological System Development and Function	Quantity of leukocytes	ZFU.30-0	-1.20	2.E-12
Hematological System Development and Function	Quantity of blood cells	ZFU.30-0	-1.35	1.E-11
Inflammatory Response	Inflammation of organ	ZFU.30-0	0.50	1.E-11
Cellular Development	Proliferation of mononuclear leukocytes	ZFU.30-0	0.33	3.E-11
Cellular Development	Proliferation of lymphocytes	ZFU.30-0	0.32	3.E-11
Cellular Development	Proliferation of lymphocytes	ZFU.40-0	-0.65	6.E-17
Cellular Growth and Proliferation	Proliferation of lymphatic system cells	ZFU.40-0	-0.65	9.E-17
Cellular Development	Proliferation of immune cells	ZFU.40-0	-0.43	2.E-16
Cellular Development	Proliferation of blood cells	ZFU.40-0	-0.69	1.E-15
Hematological System Development and Function	Quantity of leukocytes	ZFU.40-0	-1.57	1.E-14

(Catégorie : la grand catégorie de fonction, Fonction biologique : la fonction précise, Contraste : pour le contraste indiqué, le z-score et la B-H p-value (NB : pas de DisFun sous une B-H<10⁻³ pour LAG.20-0)). Les z-scores positifs sont surlignés en orangé, et les négatifs en bleu. NA : z-score non estimé.

Les principales fonctions biologiques identifiées sont organisées en grandes catégories liées notamment au développement et au cycle cellulaire, au développement et au fonctionnement du système hématologique, à la réponse immunitaire à médiation cellulaire, à la structure et au développement du tissu lymphoïde, à la prolifération et à la croissance cellulaire, à la signalisation des cellules et à leurs interactions, au métabolisme des lipides, à la réponse inflammatoire et à la circulation des cellules immunitaires ainsi qu'à la mort et à la survie cellulaire.

La catégorie la plus importante est liée au développement cellulaire). Ces catégories ont été retrouvées chez toutes les races et sont présentées dans la Figure 38.

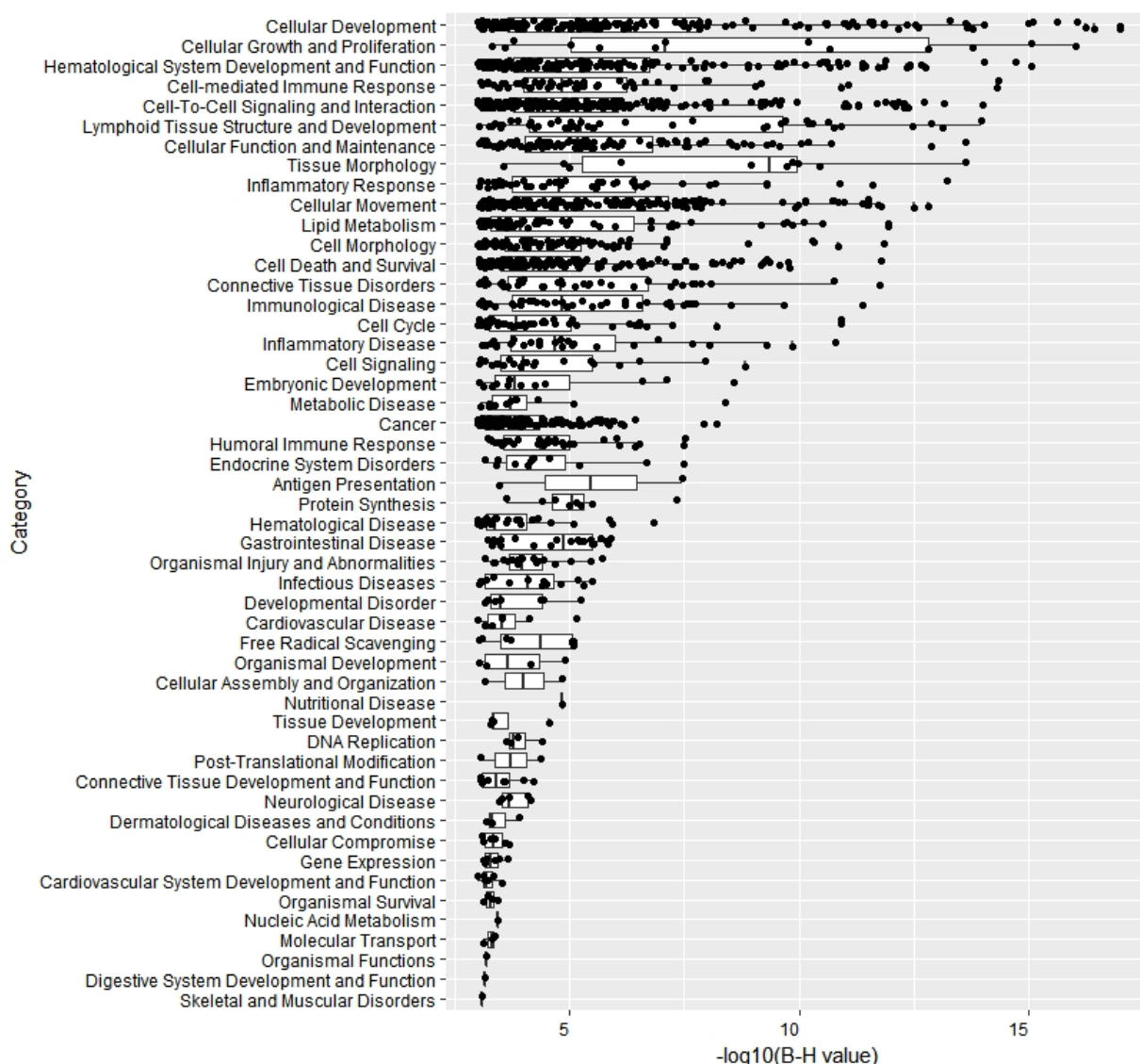


Figure 38 : Principales catégories surreprésentées au sein des races au cours de l'infection

L'axe des abscisses représente les valeurs de $-\log_{10}(\text{B-H values})$ et l'axe des ordonnées les principales catégories issues des 15 contrastes. Chaque point représente une fonction appartenant à la catégorie.

Toutes les races ont répondu de façon particulièrement intense à l'infection à DPI.40-0 et principalement en ce qui concerne les fonctions biologiques associées à la structure et au développement du tissu lymphoïde et à la réponse immunitaire

Parmi les fonctions associées au cycle cellulaire, la mitose, la ségrégation des chromosomes et la progression du cycle cellulaire ont été très enrichies et ceci de manière précoce, pour le contraste NDA.20-0 et ensuite pour le contraste NDA.30-0. Nous avons également observé, que pour le contraste ZFU.40-0, les fonctions associées au cycle cellulaire (homéostasie cellulaire,

apoptose, mort cellulaire et nécrose) ainsi que celles associées à la signalisation et aux interactions cellulaires (transduction du signal et communication) ont été très enrichies. A DPI.40-0, deux fonctions ont été particulièrement enrichies pour toutes les races avec, toutefois, des valeurs de B-H moins importantes pour la race NDA. Il s'agit de la fonction associée à la signalisation et aux interactions cellulaires ainsi que de celle associée aux mouvements cellulaires.

Les fonctions métaboliques impliquant le métabolisme et la synthèse des lipides (stéroïde, terpénoïde) et du cholestérol ont été significativement enrichies pour le contraste ZFU.20-0 (valeur moyenne B.H.value = $1,65 \cdot 10^{-10}$). Elles ont également été enrichies pour le contraste BAO.30-0.

Les fonctions associées à la réponse immunitaire ont été enrichies de manière extrêmement significative pour la race ZFU (ZFU.30-0 et ZFU.40-0). Dans l'ensemble, ces fonctions ont également été significativement enrichies dans les autres contrastes mais de manière plus faible pour la race NDA.

L'état d'activation des fonctions enrichies lors des analyses a pu être estimé grâce au calcul du z-score. Dans le cas où sa valeur absolue était égale ou supérieure à 2, ce dernier a été considéré comme significatif, un z-score ≥ 2 correspondant à une activation de la fonction, et un z-score ≤ -2 à une inhibition.

Au seuil choisi de B-H value $< 0,001$ dans au moins un contraste, nous avons identifié 201 DisFun avec $|z\text{-score}| \geq 2$. Par souci de clarté des figures, les fonctions activées et inhibées sont présentées séparément. Nous avons trouvé, parmi celles-ci, 36 fonctions possédant un z-score positif (≥ 2) dans au moins un contraste. La Figure 39 suivante montre une heatmap générée à partir des z-scores de ces DisFun.

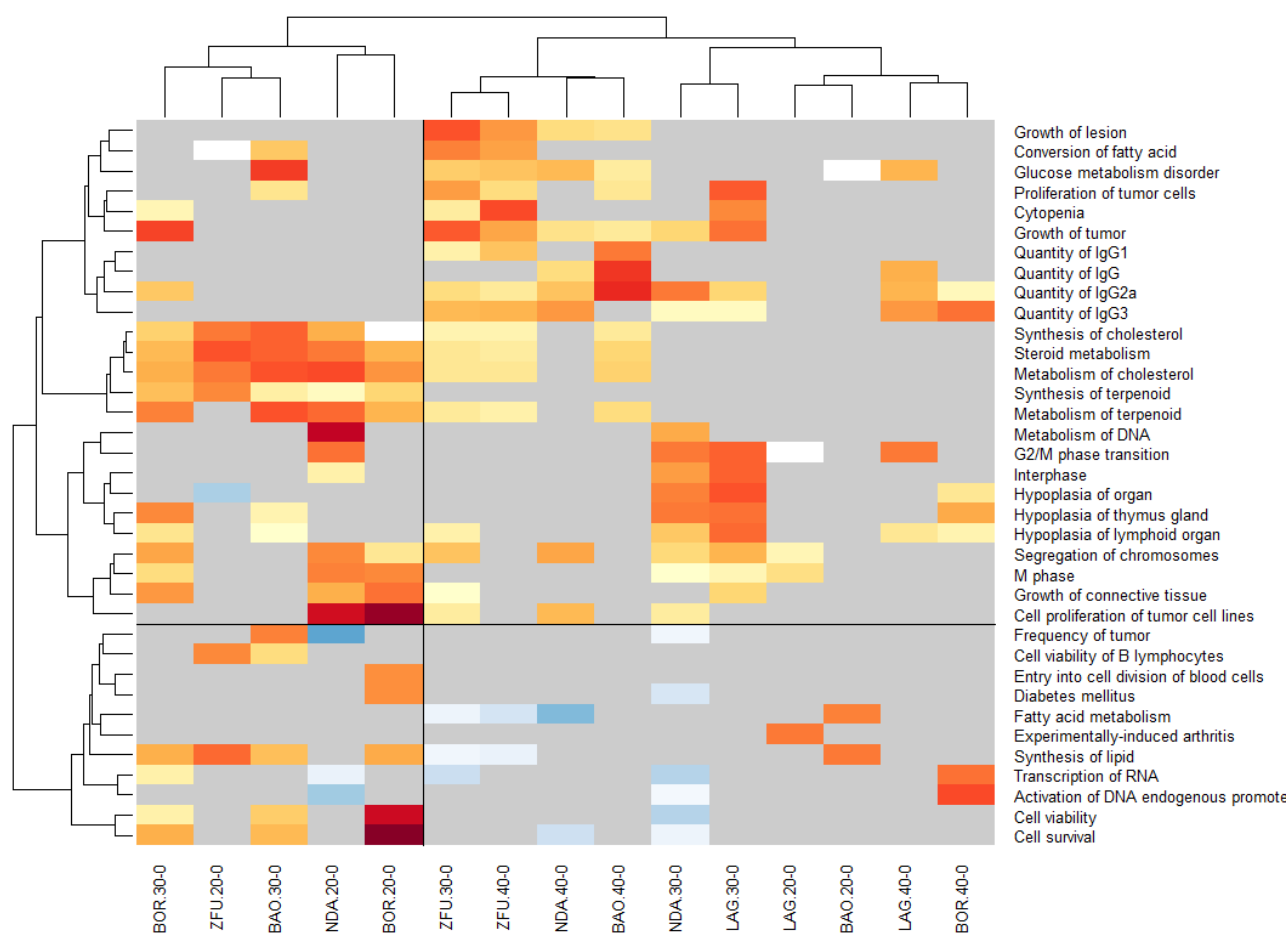


Figure 39 : Visualisation, sous forme d'une heatmap, des 36 DisFun possédant un z-score ≥ 2 dans au moins un contraste

L'axe des abscisses représente les 15 contrastes et l'axe des ordonnées représente les 36 DisFun. La couleur des rectangles, définie d'après la valeur du z-score, indique le sens d'activation de la fonction (couleurs chaudes pour une activation, couleurs froides pour une inhibition ; en gris $-1 < \text{z-score} < 1$; en blanc NA). La couleur rouge correspond à un z-score ≥ 2 et signifie que la fonction est activée de manière significative.

Afin de faciliter la compréhension des données, nous avons ensuite cherché à combiner les résultats obtenus en terme d'état d'activation avec les valeurs de B.H values associées. La Figure 40 représente, sous forme de mosaïque, les 36 DisFun possédant un z-score ≥ 2 dans au moins un contraste avec les B-H values associées.

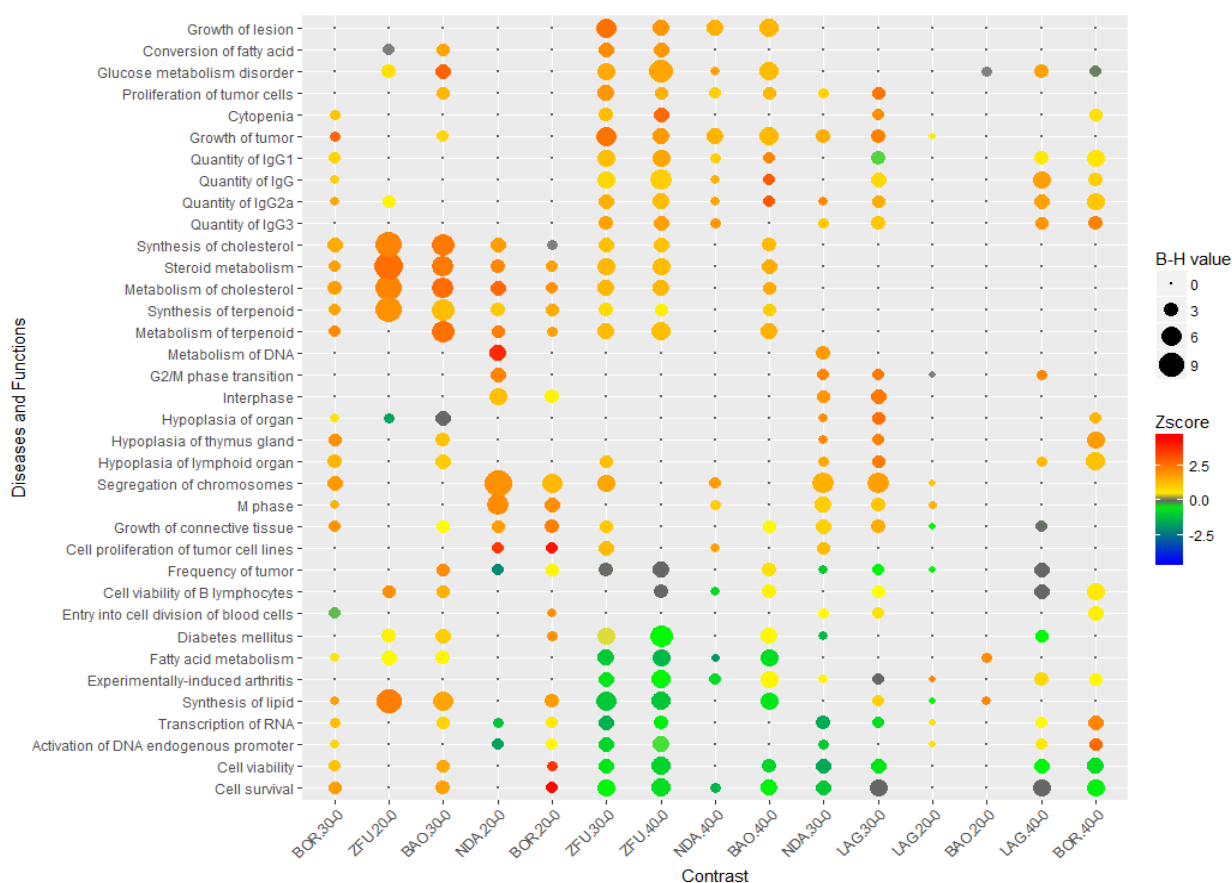


Figure 40 : Visualisation, sous forme d'une mosaïque, des 36 DisFun possédant un z-score ≥ 2 dans au moins un contraste avec les p-values (B-H) associées

L'axe des abscisses représente les 15 contrastes et l'axe des ordonnées les 36 DisFun. La taille des cercles est proportionnelle à la $-\log_{10}(\text{B-H value})$: plus le cercle est grand, plus la p-value est significative. La couleur varie en fonction de la valeur du z-score : lorsqu'une fonction est sur régulée, la couleur varie du jaune au rouge. A l'inverse, lorsqu'elle est sous régulée, la couleur varie du vert au bleu foncé ; en gris autour de 0.

On observe que les fonctions métaboliques impliquant le métabolisme et la synthèse des lipides (stéroïdes et terpénoïdes) et du cholestérol ont été fortement activées et de manière extrêmement significative pour ZFU.20-0, BAO.30-0 et NDA.20-0. On observe une tendance similaire avec toutefois des valeurs moins contrastées pour BOR.20-0, BOR.30-0 ZFU.30-0, ZFU.40-0 et BAO.40-0. Néanmoins, aucune de ces fonctions n'a été enrichie pour la race LAG.

Les fonctions associées à la réponse immunitaire de type humoral (production d'anticorps (immunoglobuline de type IgG, IgG1, IgG2a et IgG3) ont également été activées pour toutes les races à partir de DPI.30 et de façon très significative pour ZFU.30-0, ZFU.40-0 et LAG.40-0. La réponse est particulièrement activée pour BAO.40-0 (z-score 3,2 pour la quantité d'IgG2a)

Le métabolisme de l'ADN a été significativement enrichi pour NDA.20-0 et NDA.30-0. Les fonctions du cycle cellulaire qui lui sont associées ont également été enrichies de manière significative. C'est le cas des fonctions relatives à l'interphase (NDA.30-0 et LAG.30-0), à la

mitose ou phase M (NDA.20-0 et BOR.20-0), à la transition entre les phases G2 et M (NDA.20-0, NDA.30-0, LAG.30-0 et LAG.40-0) et à la ségrégation des chromosomes (NDA.20-0 et dans une moindre mesure NDA.40-0, BOR.30-0 et LAG.30-0).

On note également que des fonctions associées à la viabilité et à la survie des cellules sont très activées pour BOR.20-0 (z-score = 3,6 et 4,4 respectivement) et de façon moins marquée pour BOR.30-0 et BAO.30-0.

On observe, enfin, que des dérèglements ont eu lieu au sein des différentes races et ce, de manière très significative. Le métabolisme du glucose a été très activé pour ZFU et BAO à partir de DPI30 (particulièrement pour BAO.30-0 (B-H value = $4,3 \times 10^{-3}$, z-score = 2,8) et pour LAG.40-0. Des dérèglements se sont manifesté également au niveau du tissu sanguin avec une cytopénie (diminution du nombre de cellules sanguines saines) qui a été fortement activée pour ZFU.40-0 (B-H value = $2,4 \times 10^{-4}$, z-score = 2,7) et LAG.30-0. Enfin, nous avons observé qu'une hypoplasie des organes lymphoïdes (développement insuffisant) et notamment du thymus a été activée pour les contrastes LAG.30-0, NDA.30-0 et BOR.30-0.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux fonctions caractérisées par des z-scores négatifs. Nous avons identifié, parmi les 642 DisFun enrichies, au seuil choisi de B-H value $< 0,001$, 166 fonctions possédant un z-score négatif (≤ -2) dans au moins un contraste. Pour des raisons de visibilité, la Figure 41 suivante correspond à une heatmap représentant les 67 DisFun ayant un z-score $\leq (-3)$.

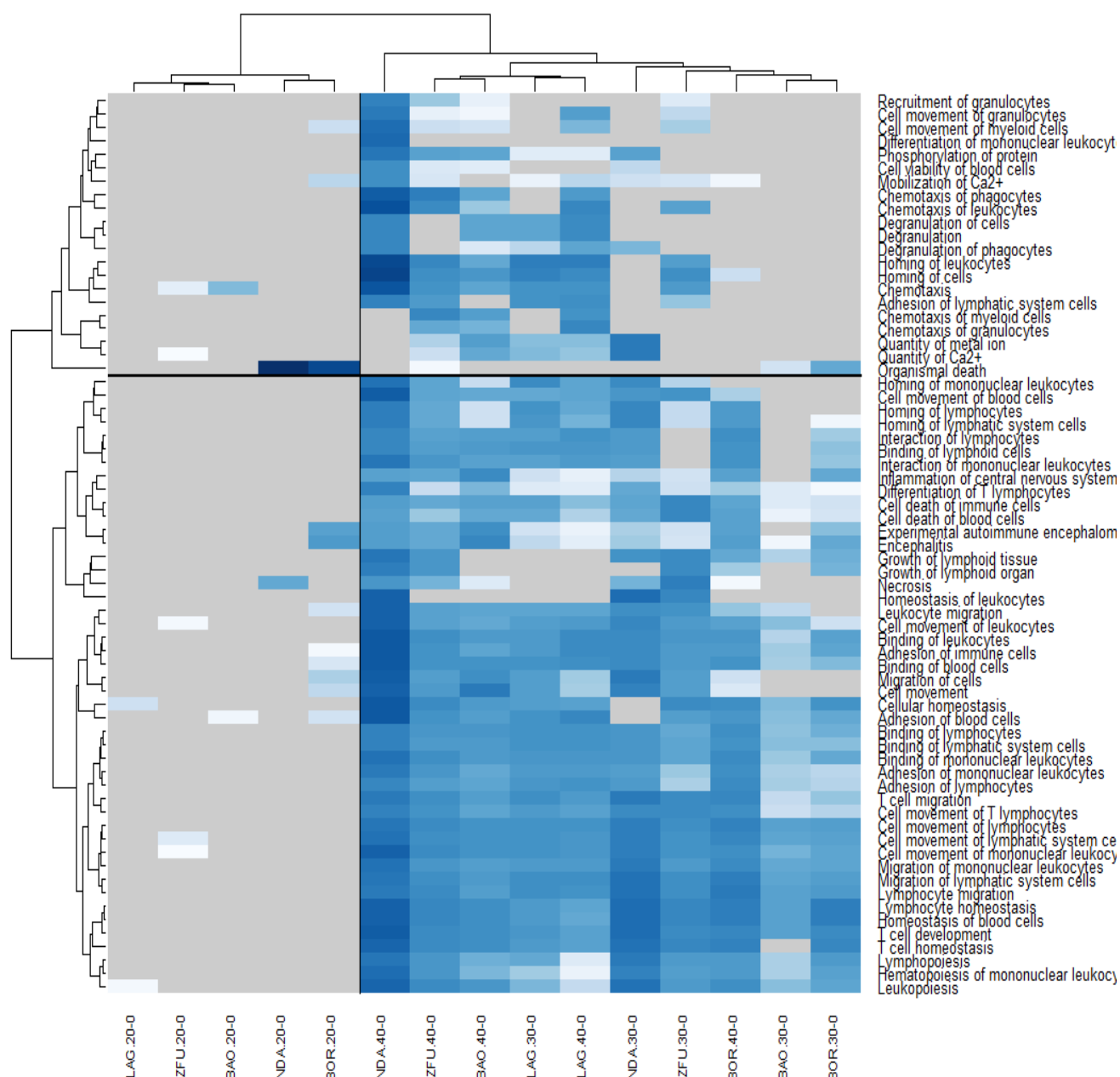


Figure 41 : Visualisation, sous forme d'une heatmap, des 67 DisFun possédant un z-score $\leq (-3)$ dans au moins un contraste

L'axe des abscisses représente les 15 contrastes et l'axe des ordonnées représente les 67 DisFun. La couleur des rectangles, définie d'après la valeur du z-score, indique le sens d'activation de la fonction (couleurs chaudes pour une activation, couleurs froides pour une inhibition ; en gris $-1 < \text{z-score} < 1$; en blanc NA). La couleur bleue correspond à un z-score $\leq (-3)$ et signifie que la fonction est inhib e de manière significative.

De la même manière que précédemment, nous avons cherché à combiner les informations au sein d'une même figure afin de rendre l'interprétation plus ais e. La Figure 42 suivante représente, sous forme de mosaïque, les 67 DisFun possédant un z-score $\leq (-3)$ dans au moins un contraste avec les B-H values associ es.

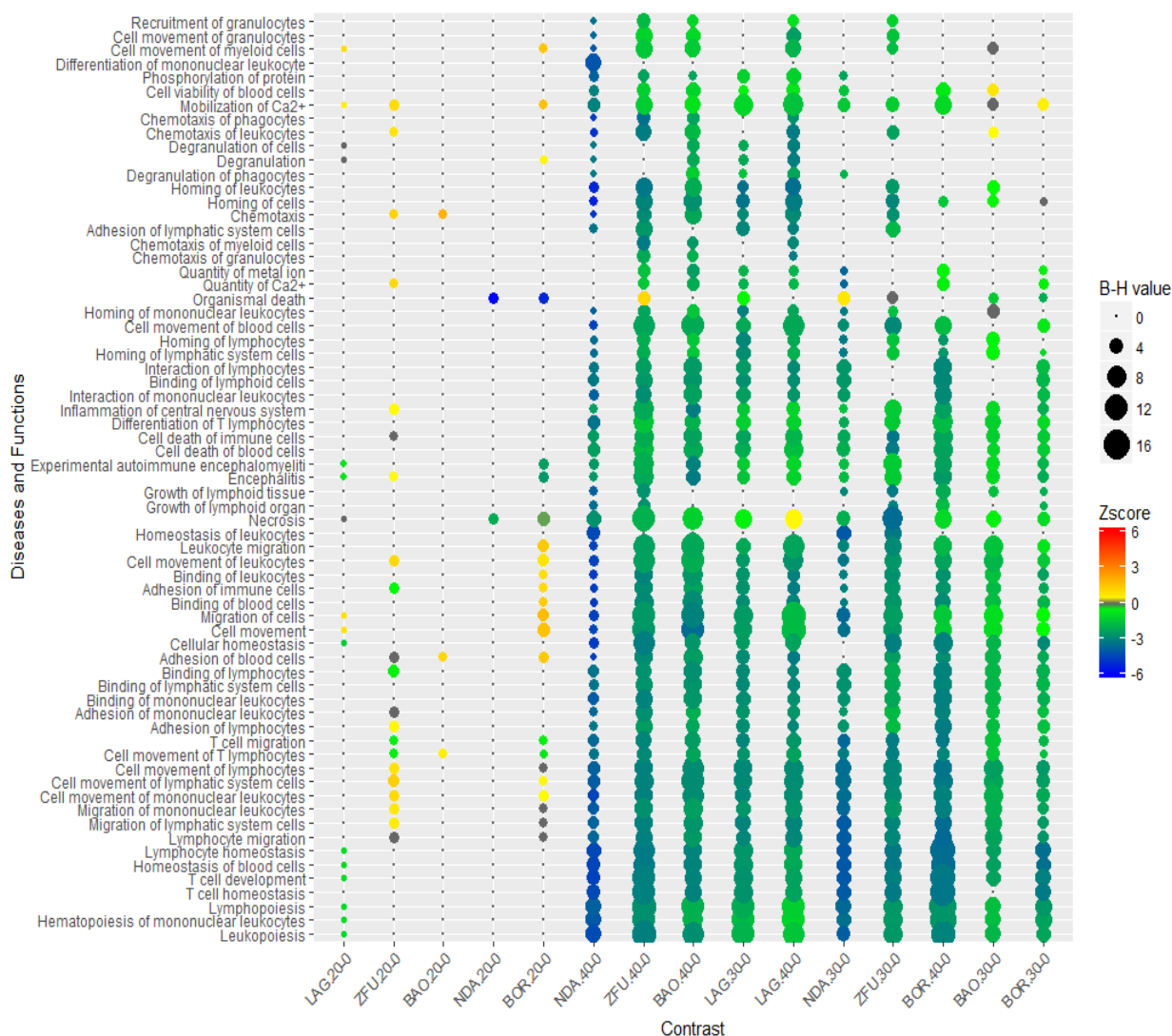


Figure 42 : Visualisation, sous forme d'une mosaïque, des 67 DisFun possédant un z-score $\leq (-3)$ dans au moins un contraste avec les p-values (B-H) associ es

L'axe des abscisses représente les 15 contrastes et l'axe des ordonnées les 67 DisFun.

La Figure 41 montre de façon très nette que le niveau de classification s'effectue en fonction du temps d'infection. Les dates relatives à la phase précoce (DPI.20) sont group es ensemble sur la gauche de la figure.

C'est au cours de l'entrée en phase chronique de l'infection (DPI30 et DPI40) qu'on a observé le plus grand nombre de fonctions inhib es de manière très significative et ceci pour toutes les races et particulièrement pour NDA.40-0.

Les fonctions associ es à la réponse immunitaire de type cellulaire ont été extrêmement inhib es avec une significativité très importante. Les fonctions associ es au mouvement, à la migration et à l'adhésion cellulaire (« homing » des leucocytes notamment des leucocytes mononucléaires) ont été significativement inhib es chez toutes les races à partir de DPI30.

Les fonctions relatives à l'homéostasie cellulaire et principalement l'homéostasie des cellules sanguines ont été inhibées de façon très significative. C'est notamment le cas de l'homéostasie des leucocytes (NDA.30-0, NDA.40-0 et ZFU.30-0) et plus spécifiquement des cellules T pour toutes les races. La dégranulation des cellules et notamment des phagocytes a été significativement inhibée pour BAO.40-0, LAG.30-0 et LAG.40-0. Le chimiotactisme des leucocytes et notamment des cellules myéloïdes tels que les granulocytes a été significativement inhibé à DPI40 pour ZFU, BAO et LAG.

Des fonctions relatives à la signalisation cellulaire comme la phosphorylation des protéines, la quantité de Ca^{2+} ou encore la quantité d'ion métallique ont également été inhibées de manière significative pour ZFU.40-0, BAO.40-0, LAG.30-0, LAG.40-0, NDA.30-0, BOR.30-0 et BOR.40-0.

De manière assez étonnante, les 5 races semblent répondre de façon similaire à l'infection.

2.4.2.2 Canonical Pathways (CanPath)

La table de sortie des CanPath a comporté 363 lignes, correspondant chacune à une voie métabolique ou une voie de signalisation, dont la p-value a été inférieure à 0,05 dans l'un des 15 contrastes intra-race, correspondant à une p-value corrigée, calculée par IPA avec la méthode de Benjamini-Hochberg (B-H), de 0,33. La p-value maximale a été de 10^{-24} , correspond à une B-H value de 10^{-22} .

La table de résultats des CanPath étant plus réduite que celle des DisFun, et avec moins de redondance, nous avons choisi un seuil de B-H value $< 0,01$, et nous avons identifié 92 CanPath enrichis de manière significative dans au moins un contraste. Le Tableau 10 contient les détails des CanPath pour chacun des 15 contrastes ainsi que les B.H values associées.

Tableau 10 : CanPath enrichies au seuil de B-H value < 0,01 dans au moins un contraste (-log10(B-H value))

Canonical Pathways	NDA.20.0	NDA.30.0	NDA.40.0	ZFU.20.0	ZFU.30.0	ZFU.40.0	LAG.20.0	LAG.30.0	LAG.40.0	BAO.20.0	BAO.30.0	BAO.40.0	BOR.20.0	BOR.30.0	BOR.40.0
Superpathway of Cholesterol Biosynthesis	5.4	2.0	0.8	21.9	7.2	5.0	0.4	2.3	0.2	0.0	11.7	4.8	2.2	6.8	1.1
Cholesterol Biosynthesis I	2.0	0.6	0.3	10.2	5.4	2.9	0.3	1.2	0.0	0.0	5.9	2.7	0.5	3.8	0.3
Cholesterol Biosynthesis II (via 24, 25-dihydrocholesterol)	2.0	0.6	0.3	10.2	5.4	2.9	0.3	1.2	0.0	0.0	5.9	2.7	0.5	3.8	0.3
Cholesterol Biosynthesis III (via Desmosterol)	2.0	0.6	0.3	10.2	5.4	2.9	0.3	1.2	0.0	0.0	5.9	2.7	0.5	3.8	0.3
Mitochondrial Dysfunction	6.0	11.8	7.2	0.2	1.1	1.4	0.4	2.9	0.5	0.0	0.0	0.6	0.4	2.4	0.9
Oxidative Phosphorylation	6.3	11.8	9.6	0.0	0.8	0.8	0.3	2.7	0.2	0.0	0.0	0.3	0.2	1.5	0.5
Sirtuin Signaling Pathway	6.3	6.7	5.9	0.3	1.6	1.1	0.5	1.6	0.2	0.0	0.7	1.0	0.9	1.2	0.7
Superpathway of Geranylgeranyldiphosphate Biosynthesis	2.5	0.9	0.5	10.0	1.5	2.0	0.4	1.4	0.5	0.0	4.3	1.9	1.4	1.8	0.9
Mevalonate Pathway I	2.5	1.0	0.4	9.1	1.6	2.1	0.3	1.2	0.3	0.0	4.2	2.0	1.1	1.8	0.8
LXR/RXR Activation	1.0	0.2	0.5	6.4	2.7	5.1	0.2	0.5	0.3	1.4	4.1	2.6	1.1	1.8	0.5
Hematopoiesis from Pluripotent Stem Cells	0.4	2.0	0.8	1.3	1.7	1.7	0.2	2.0	1.1	0.0	5.1	2.1	0.5	1.5	3.0
Primary Immunodeficiency Signaling	0.1	2.0	0.9	1.8	1.0	1.8	0.0	1.5	0.9	0.0	4.1	2.6	0.5	1.2	4.2
TCA Cycle II (Eukaryotic)	2.9	3.1	2.9	0.0	1.3	0.9	0.1	2.3	0.7	0.0	0.9	3.1	0.4	2.0	1.1
Cell Cycle: G2/M DNA Damage Checkpoint Regulation	4.0	2.3	1.2	0.0	2.5	0.9	1.4	2.9	1.2	0.0	0.0	0.2	1.5	1.3	0.3
Granulocyte Adhesion and Diapedesis	0.3	0.2	1.0	1.0	3.3	3.0	0.3	1.2	1.5	0.9	2.5	4.7	0.6	0.5	0.4
iCOS-iCOSL Signaling in T Helper Cells	0.1	1.0	0.6	0.6	1.7	2.8	0.0	1.2	1.2	0.0	2.1	2.9	0.3	1.2	4.2
Role of NFAT in Regulation of the Immune Response	0.2	0.9	0.2	0.7	0.9	2.6	0.1	1.4	1.1	0.4	3.0	2.6	0.6	1.8	3.1
Leukocyte Extravasation Signaling	0.3	1.2	0.5	0.7	1.4	2.7	0.3	2.3	1.8	0.0	2.4	3.1	0.5	0.9	1.7
Fc Epsilon RI Signaling	0.1	1.0	0.9	0.6	1.1	3.0	0.3	2.0	1.5	0.0	1.9	3.5	0.4	0.8	1.7
G-Protein Coupled Receptor Signaling	0.1	0.3	2.0	0.6	2.9	3.7	0.2	1.5	1.2	0.0	1.4	2.6	0.4	0.6	0.9
Natural Killer Cell Signaling	0.0	1.2	0.8	0.6	1.2	2.9	0.1	1.9	1.5	0.0	0.9	3.4	0.0	1.2	2.6
Th1 and Th2 Activation Pathway	0.0	0.8	0.9	1.1	1.7	3.6	0.0	1.2	0.9	0.0	2.4	1.7	0.1	0.7	2.7
T Cell Receptor Signaling	0.2	1.4	0.2	0.6	0.8	1.6	0.0	1.5	1.0	0.0	3.0	2.1	0.3	1.0	3.0

Ce tableau a permis de mettre en évidence trois groupes distincts.

Le premier groupe de contrastes est formé par les contrastes ZFU et les contrastes BAO.30-0, BAO.40-0 et BOR.30-0. Les voies associées au métabolisme et à la biosynthèse du cholestérol ont été significativement enrichies, et ce de manière très précoce, pour les contrastes ZFU et, avec des valeurs moins importantes dans les autres contrastes du groupe. On observe également, au sein des contrastes de ce groupe, que les voies associées à la réponse immunitaire ont également été enrichies, notamment l'hématopoïèse des cellules souches pluripotentes (valeur la plus importante pour BAO.30-0), l'adhésion et la diapédèse des granulocytes (valeur la plus importante pour BAO.40-0) ou encore la signalisation du récepteur membranaire TREM1 des cellules myéloïdes (valeur la plus importante pour ZFU.40-0).

Le second groupe est composé par les contrastes NDA. Au sein de ce groupe, la voie de signalisation des sirtuines, le dérèglement des mitochondries et la phosphorylation oxydative ont été très enrichies. On trouve, dans une moindre mesure, des voies enrichies associées au cycle cellulaire (entrée en phase S médiée par les œstrogènes, cyclines et régulation du cycle cellulaire ou encore une voie associée à la réparation de l'ADN).

Le dernier groupe est constitué des contrastes LAG ainsi que BAO.20-0, BOR.20-0 et BOR.40-0. On constate que peu de CanPath sont significativement enrichies au sein de ce dernier groupe. On note pour LAG.30-0 que le dérèglement des mitochondries et la phosphorylation oxydative ont été enrichies avec cependant des intensités plus faibles que les valeurs observées pour NDA. Des voies associées au cycle cellulaire ont également été enrichies. Parmi elles, le cycle de Krebs (TCA Cycle II (Eukaryotic)) et une voie associée à la réparation de l'ADN (G2/M DNA Damage Checkpoint Regulation) pour LAG.30-0 ainsi qu'une voie associée dans la régulation de la mitose (Mitotic Roles of Polo-Like Kinase) pour BOR.20-0. Des voies associées à la réponse immunitaire ont été enrichies pour les contrastes BOR.40-0 et LAG.30-0.

Nous avons ensuite regardé les CanPath enrichies et ayant un z-score ≥ 2 en valeur absolue. La Figure 43 suivante montre, sous la forme d'une heatmap, les 45 CanPath possédant les z-scores les plus importants au seuil de B-H value $< 10^{-2}$.

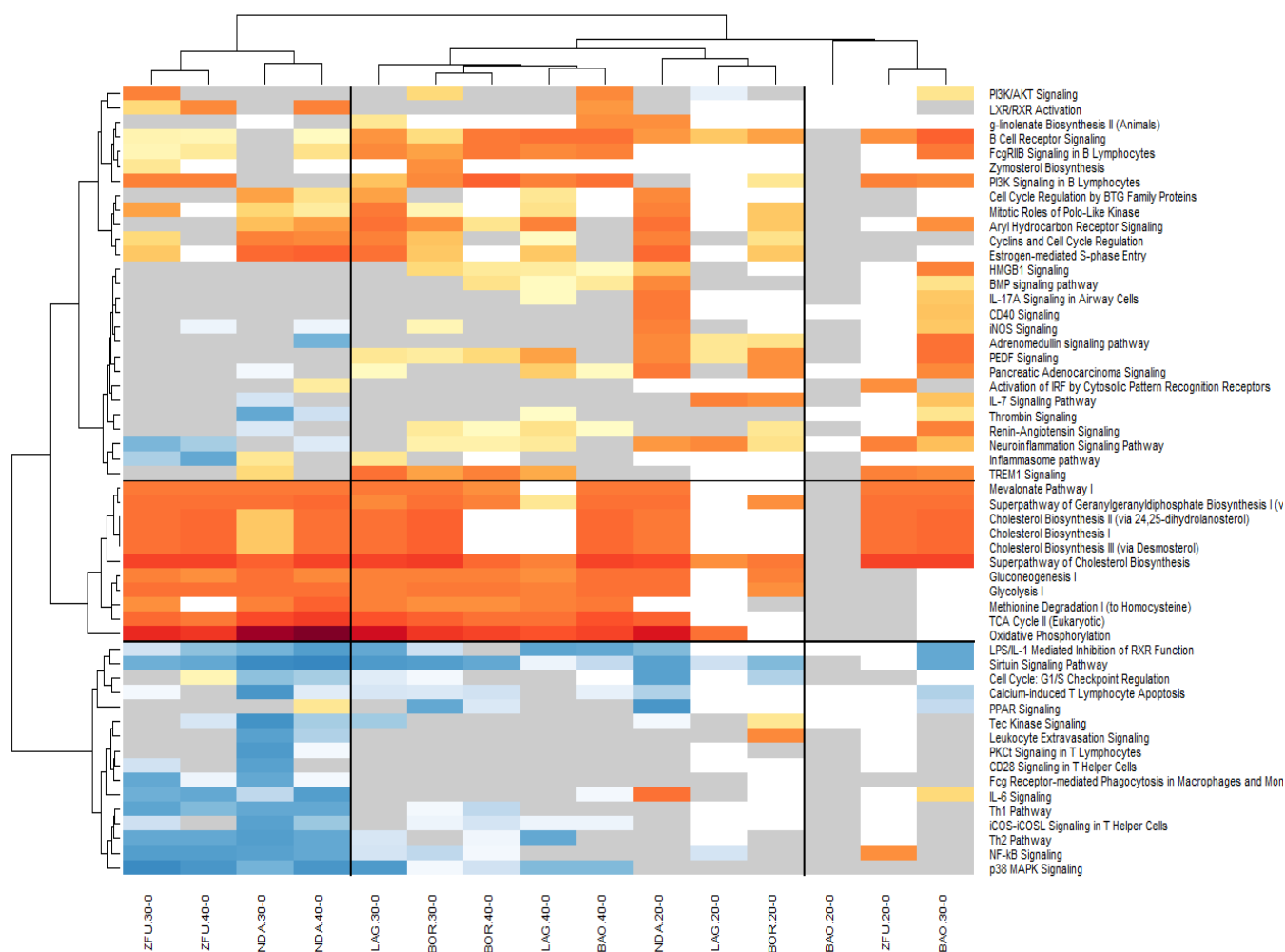


Figure 43 : Visualisation, sous forme d'une heatmap, des 45 CanPath possédant un z-score $\geq |2|$ dans au moins un contraste

L'axe des abscisses représente les 15 contrastes et l'axe des ordonnées représente les 45 CanPath.

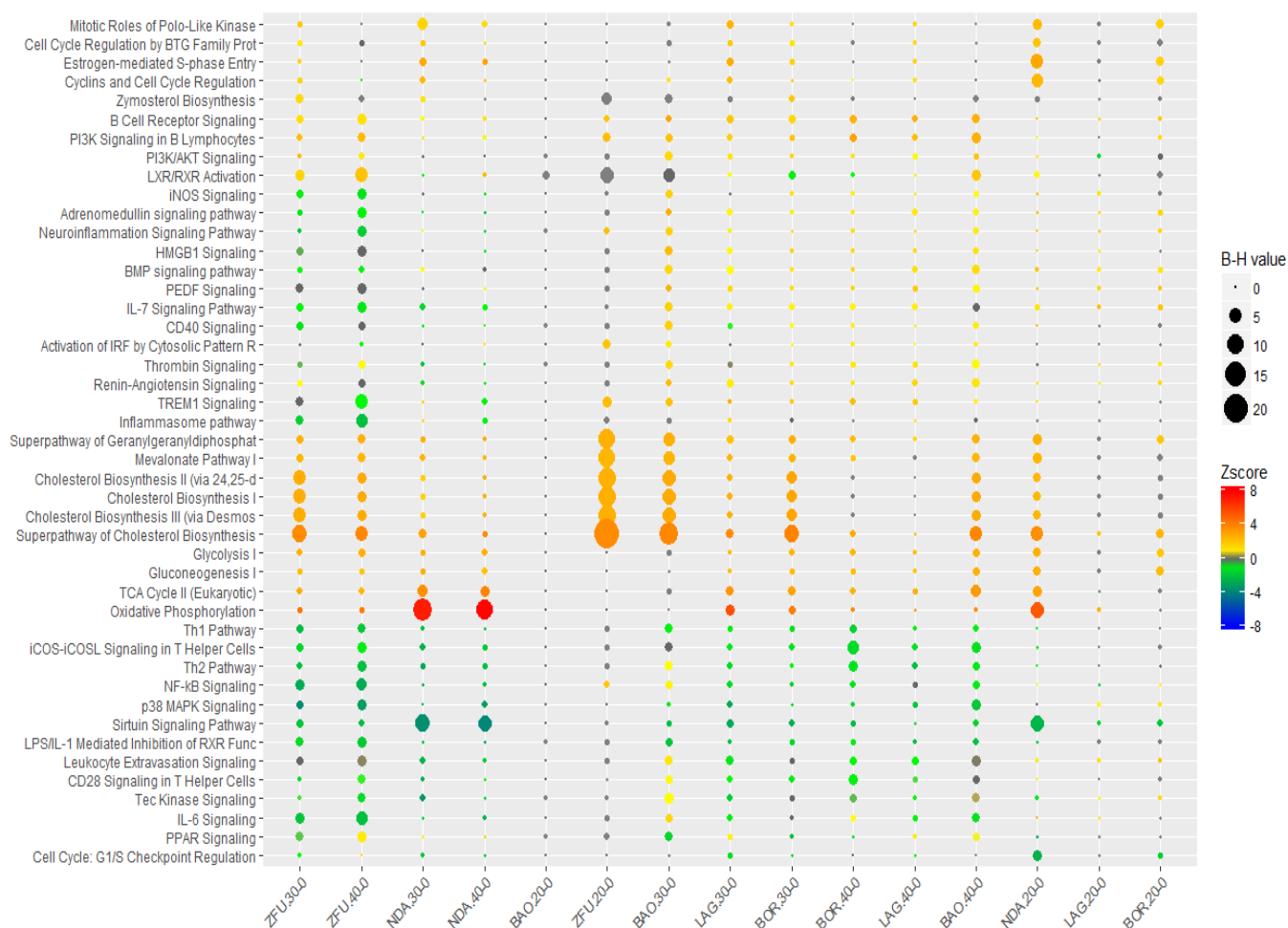


Figure 44 : Visualisation, sous forme d'une mosaïque, des 45 CanPath possédant un z-score $\geq |2|$ dans au moins un contraste au seuil de B-H p-value $<10^{-2}$

La Figure 43 a permis de mettre en évidence 3 niveaux d'organisation des CanPath.

En bas du graphique, un premier niveau d'organisation est caractérisé par des voies associ es à la réponse immunitaire de type cellulaire. Ces voies ont été significativement inhib es pour toutes les races à partir de DPI30.

C'est notamment le cas des voies métaboliques Th1 et Th2 (pour ZFU.30-0, ZFU.40-0 et BOR.40-0), des cellules T helper (iCOS-iCOSL) (pour ZFU.30-0, ZFU.40-0, BOR.40-0 et BAO.40-0), de la voie de signalisation du NF-kB (pour ZFU.30-0 et ZFU.40-0), des protéines kinases MAPK p38 (pour ZFU.30-0, ZFU.40-0 et BOR.40-0), de la voie li e à l'inhibition par le LPS/IL-1 de la fonction RXR et aussi de la voie de signalisation de l'IL6 (pour ZFU.30-0 et ZFU.40-0). La voie de signalisation des sirtuines a été très significativement inhib e pour la race NDA d s DPI20.

Au centre de la Figure 43, on observe un deuxième niveau d'organisation caractérisé par les voies associ es au métabolisme (cholestérol, glycolyse, gluconéogénèse ou encore phosphorylation oxydative). Ces voies ont été fortement activ es et de manière précoce chez

toutes les races sauf pour BAO.20-0 et dans une moindre mesure pour LAG.20-0 et BOR.20-0. La Figure 43 montre que ces voies ont été fortement activées de manière extrêmement significative dès le temps 20 pour ZFU et NDA. Il est visible également que ces 2 races conservent des tendances similaires tout au long de l'infection. Toutefois, on note, au sein de ces voies métaboliques, des nuances importantes : la voie associée à la biosynthèse du cholestérol a été particulièrement activée de façon très significative pour ZFU et ceci de manière précoce alors que, pour NDA, c'est la voie associée à la phosphorylation oxydative qui a été très enrichie et très activée dès le temps 20 et de manière encore plus évidente à DPI30 et DPI40 (z-score > 7,5). Quant aux autres races, les voies associées au métabolisme n'ont été activées de manière significative qu'à partir de DPI30 et surtout en ce qui concerne BAO.30-0, BAO.40-0, BOR.30-0 et LAG.30-0. La voie d'activation LXR/RXR a été également activée de manière significative pour ZFU.30-0, ZFU.40-0 et BAO.40-0.

Enfin, un dernier niveau de classification se distingue en haut de la Figure 43. Les voies associées au cycle cellulaire (rôles mitotiques de la polo-like kinase, régulation du cycle cellulaire par les protéines de la famille BTG, cyclines et régulation du cycle cellulaire) ont été enrichies et activées dans les contrastes NDA et LAG. Les voies associées à la réponse immunitaire de type humoral ont été activées de manière significative. Parmi elles, on trouve la voie de signalisation des récepteurs des cellules B ou encore la voie de signalisation de la PI3K dans les lymphocytes B.

Deux voies associées à l'immunité innée ont été significativement inhibées pour ZFU.40-0. Il s'agit de la voie de signalisation TREM1 et la voie métabolique de l'inflammasome.

Nous notons également que plusieurs voies ont été enrichies de manière significative mais sans que l'analyse fonctionnelle n'ait permis d'estimer leur état d'activation. C'est le cas des voies enrichies chez ZFU, BAO.30-0 et BAO.40-0 et associées à l'hématopoïèse des cellules souches pluripotentes, à l'adhésion, à la diapédèse des granulocytes et des agranulocytes ainsi que la voie associée à la signalisation des cellules NK.

2.4.2.3 Upstream Regulators (UpStream)

La table de résultat des UpStream contient 2582 molécules considérées comme des Upstream regulators, avec une p-value < 0,05 dans au moins un contraste (NB : IPA ne propose pas de correction de Benjamini-Hochberg). Ces molécules correspondent à des protéines, des micro-ARN ou des métabolites de l'hôte, mais peuvent aussi être des molécules exogènes (par exemple

des médicaments ou des produits bactériens). Dans notre contexte, nous n'avons gardé que des UpStream correspondant à des protéines ou des métabolites endogènes.

Au seuil de $p\text{-value} < 10^{-4}$, 316 UpStream ont été considérés comme significativement enrichis dans au moins un contraste.

L'analyse fonctionnelle a permis de mettre en évidence, de manière significative, des UpStream présents chez toutes les races et dans la grande majorité des contrastes. Parmi eux, nous trouvons : TGFB1 (présents dans 14 contrastes sur 15), TNF (13 contrastes/15), CSF2 et Vegf (12 contrastes/15), TCF3, IL4, PTEN (11 contrastes/15) ou encore HGF, TCR, IL2, IL15 et IL7 (10 contrastes/15).

Dans le mode de classification proposé par le logiciel IPA, les 316 UpStream s'organisent en différentes catégories (cytokine, enzyme, facteur de croissance, facteur de transcription, kinase..). Parmi les 316 UpStream enrichis de manière significative, la catégorie correspondant aux facteurs de transcription totalise 95 UpStream et 26 UpStream appartiennent à la classe des cytokines.

Nous avons regardé, au seuil de $p\text{-value} < 10^{-6}$, les UpStream enrichis et ayant un $z\text{-score} \geq 2$ en valeur absolue dans au moins un contraste. La Figure 45 montre, sous la forme d'une heatmap, les 88 UpStream activés ou inhibés au sein des 15 contrastes.

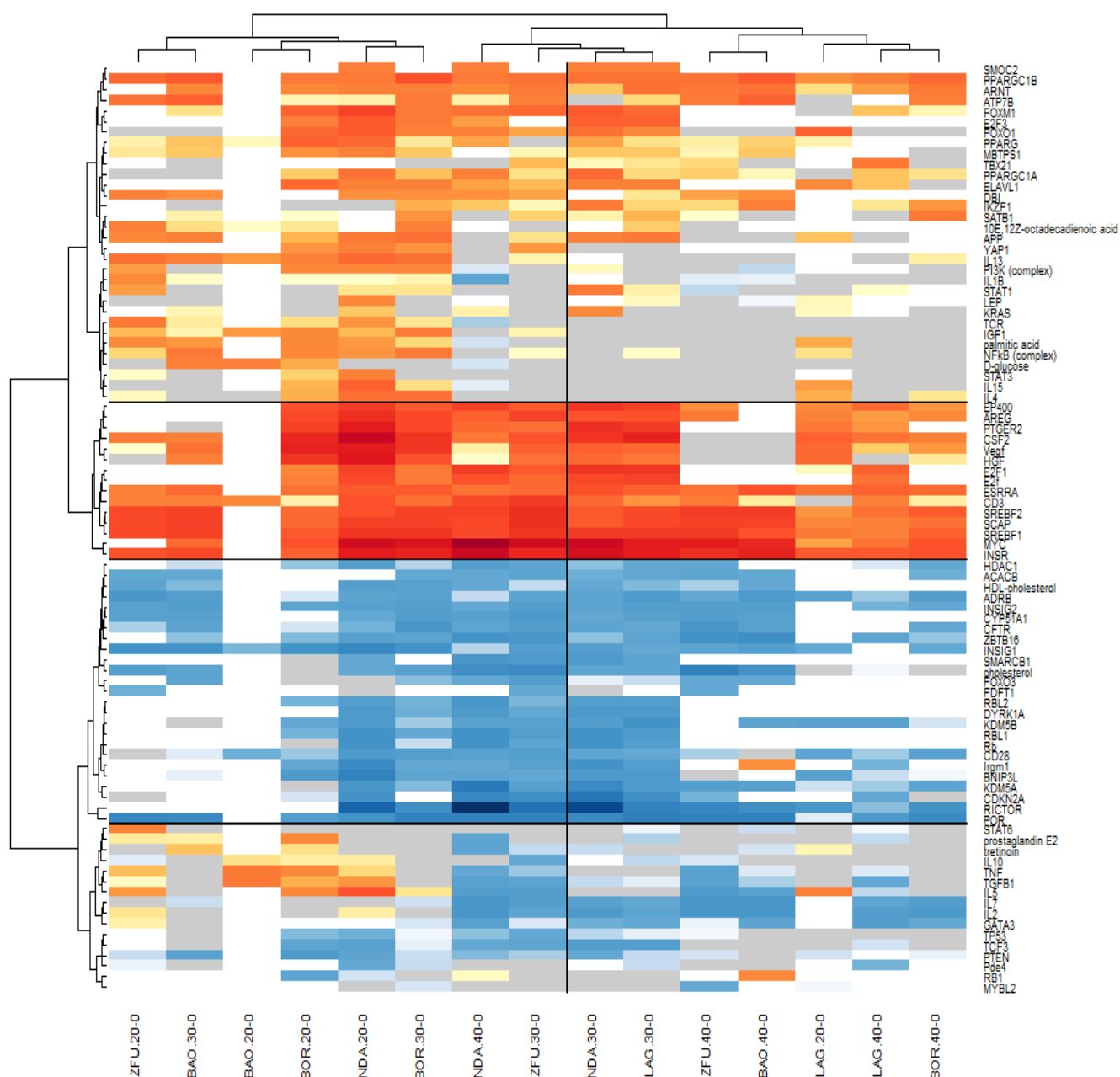


Figure 45 : Visualisation, sous forme d'une heatmap, des 88 UpStream possédant un z-score $\geq |2|$ dans au moins un contraste au seuil de p-value $< 10^{-6}$

L'axe des abscisses représente les 15 contrastes et l'axe des ordonnées représente les 88 UpStream.

On observe sur ce graphique que les UpStream s'organisent en 2 groupes séparés en fonction de la valeur de z-score. En rouge, on trouve les UpStream activés de manière significative et en bleu ceux qui sont inhibés, avec un sous-groupe qui comprend des UpStream plutôt activés au temps 20 puis inhibés par la suite.

Les UpStream activés de manière significative au sein des différents contrastes sont représentés dans la Figure 46 suivante.

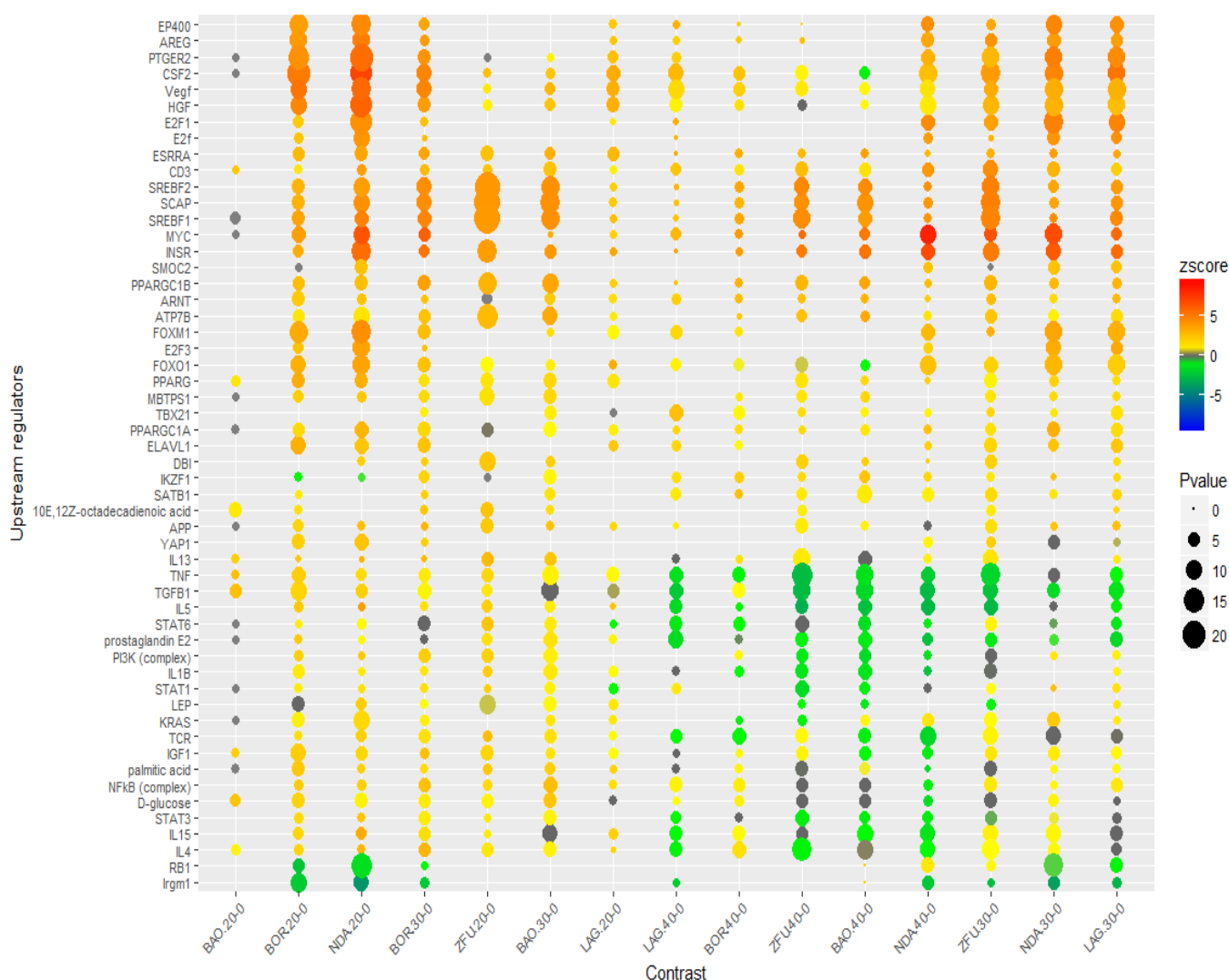


Figure 46 : Visualisation, sous forme d'une mosaïque, des 88 UpStream possédant un z-score ≥ 2 dans au moins un contraste au seuil de p-value $< 10^{-6}$

On constate tout d'abord que très peu d'UpStream ont été activés de manière significative pour BAO.20-0.

De nombreux UpStream ont été significativement activés avec des valeurs très élevées de z-score pour NDA (particulièrement NDA.20-0) et les contrastes BOR.20-0, BOR.30-0, ZFU.30-0 et LAG.30-0, à savoir notamment MYC, INSR, PTGER2, CSF2, Vegf, HGF, SREBF2, SCAP, SREBF1, EP400, AREG, FOXM1, FOXO1 et E2F3. On note, de plus, que chez la race NDA, certains UpStream ont été activés de manière très forte en comparaison aux autres races. C'est le cas de MYC (p-value = $1,7 \times 10^{-10}$, z-score = 8,2) pour NDA.40-0, CSF2 (p-value = $7,4 \times 10^{-19}$, z-score = 6,7) pour NDA.20-0 et INSR (p-value = $2,1 \times 10^{-15}$, z-score = 5,5) pour NDA.20-0. On a observé également une activation importante et très significative des UpStream, SREBF1, SREBF2, SCAP, INSR ainsi que MYC pour tous les contrastes sauf BAO.20-0 et dans une moindre mesure LAG.20-0, LAG.40-0 et BOR.40-0. CD3 a été particulièrement activé pour

ZFU.30-0 et NDA.40-0. Trois UpStream ont été principalement activés de façon très significative chez ZFU, il s'agit de SREBF1, SREBF2 et SCAP.

D'autres UpStream ont également été activés de manière significative avec toutefois des valeurs moins contrastées.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux UpStream inhibés de manière significative au sein des contrastes. La Figure 47 suivante regroupe, pour les 15 contrastes, les 88 UpStream possédant un z-score ≤ 2 dans au moins un contraste au seuil de p-value $<10^{-6}$.

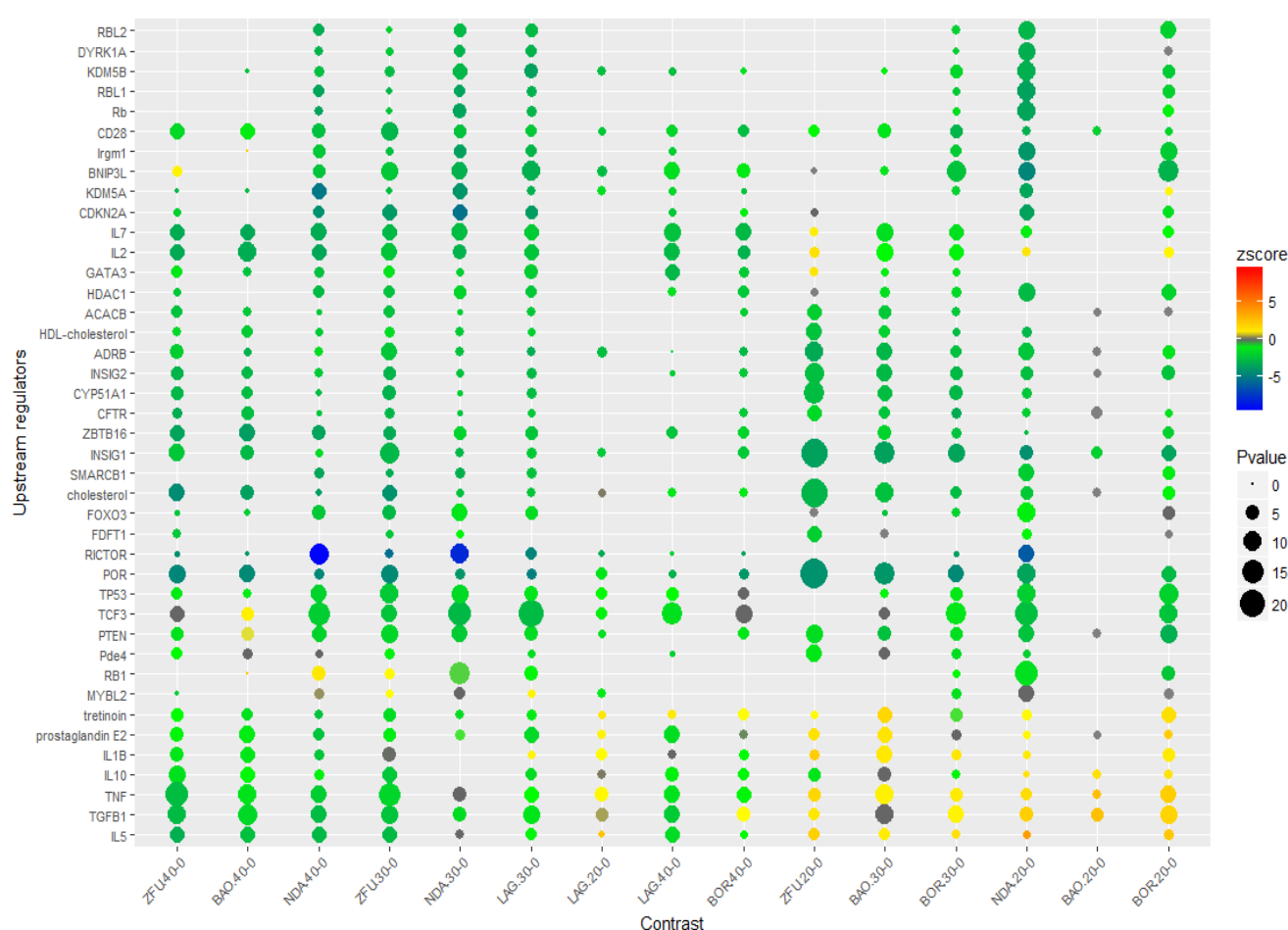


Figure 47 : Visualisation, sous forme d'une mosaïque, des 88 UpStream possédant un z-score ≤ 2 dans au moins un contraste au seuil de p-value $<10^{-6}$

Nous constatons, comme précédemment, que très peu d'UpStream ont été inhibés de manière significative pour BAO.20-0.

De nombreux UpStream ont été fortement inhibés au cours de l'infection et ce, de manière très significative. Cela a été notamment le cas de RICTOR, CDKN2A et RDM5A pour NDA dès DPI20. Le cholestérol, POR et CYP51A1 ont été très significativement inhibés pour ZFU

(particulièrement pour ZFU.20-0), BAO.30-0 et BAO.40-0. INSIG1 a été également très significativement inhibé pour ZFU.20-0 et BAO.30-0 et avec des valeurs plus faibles pour BOR.20-0, BOR.30-0, NDA.20-0, ZFU.30-0, ZFU.40-0 et BAO.40-0.

Des UpStream relatifs à des cytokines (IL5, IL10 et TNF) ainsi que le facteur de croissance TGFB1 ont été très significativement inhibés pour BAO.40-0, NDA.40-0 ainsi que LAG et ZFU à partir de DPI30. On a observé une tendance similaire pour TP53, TCF3 et PTEN pour les contrastes NDA ainsi que ZFU, LAG et BOR à DPI30.

Les UpStream CD28 (pour ZFU dès DPI20), IL2 et IL7 ont été inhibés de façon très significative pour toutes les races à partir de DPI30. Quelques UpStream ont présenté des profils atypiques au cours du processus infectieux. En effet, on observe qu'ils ont été activés en début d'infection (DPI.20-0) puis inhibés et cela avec une dynamique similaire pour les différentes races. Cela concerne STAT6 (sauf pour LAG.20-0), prostaglandine E2 (sauf pour BAO.20-0), le facteur de croissance TGFB1, des cytokines telles que l'IL1B, IL4, IL5, IL15 ou encore TNF.

Plus largement, on remarque que certains UpStream ont été significativement enrichis mais l'analyse fonctionnelle n'a pas permis de déterminer un sens d'activation, c'est notamment le cas pour l'IFN γ .

2.4.3 Analyse fonctionnelle des gènes DE unique à une race

Nous avons cherché à déterminer la spécificité de chaque race au cours de l'infection. Nous avons donc effectué une analyse fonctionnelle basée sur les gènes DE de manière unique au sein d'une race. Cette liste de gènes correspond à la partie bleue de la Figure 27.

L'analyse a permis d'identifier, seulement chez la race NDA à DPI.30 et DPI.40, trois CanPath (« Oxydative Phosphorylation », « Mitochondrial Dysfunction » et « Sirtuin Signaling Pathway » ainsi que deux Disfun (« Mitochondrial respiratory chain deficiency », « Mitochondrial disorder »). Les valeurs de B-H value et z-score associées sont renseignées dans le Tableau 11 suivant.

Tableau 11 : Fonctions associées au métabolisme énergétique chez la race NDA à partir de DPI.30

DisFun	NDA.30-0		NDA.40-0	
	B-H value	Zscore	B-H value	Zscore
Mitochondrial respiratory chain deficiency	6.3×10^{-5}	N/A	3.1×10^{-3}	N/A
Mitochondrial disorder	4.3×10^{-5}	N/A	4.9×10^{-3}	N/A
Canonical Pathways	NDA.30-0		NDA.40-0	
	B-H value	Zscore	B-H value	Zscore
Oxidative Phosphorylation	2.9×10^{-7}	4	6×10^{-8}	5.4
Mitochondrial Dysfunction	3.5×10^{-6}	N/A	1.6×10^{-5}	N/A
Sirtuin Signaling Pathway	3.6×10^{-3}	-3.2	5.4×10^{-3}	-2.9

Trois UpStream ont été trouvés comme étant significativement inhibés chez la race NDA à DPI.30 et DPI.40. Il s'agit de RICTOR (z-score = -4,8 et z-score = -6,4 respectivement), KDM5A (z-score = -3,5 et z-score = -4,1 respectivement) et RB1 (z-score = 2 et z-score = 2,9 respectivement). Quatre UpStream ont été trouvés comme étant significativement activés chez la race ZFU à DPI.30. Il s'agit du cholestérol (z-score = 2,6), SCAP (z-score = 2,2), SREBF1 (z-score = 2,4), SREBF2 (z-score = 2). On trouve également IRF7 chez ZFU.40-0. En ce qui concerne la race BAO, BOR et LAG, aucune information n'a été trouvée comme étant significative.

Les informations issues de ces listes spécifiques de gènes DE sont semblables à celles retrouvées dans les listes globales à savoir, des voies métaboliques et des régulateurs en amont impliqués dans la phosphorylation oxydative chez la race NDA et des UpStream impliqués dans le métabolisme du cholestérol chez la race ZFU.

2.4.4 Analyse fonctionnelle croisée des contrastes intra et inter races

Nous avons ensuite cherché à savoir si des gènes DE entre les races avant l'infection pouvaient jouer un rôle dans la régulation des fonctions biologiques au cours du temps.

Nous avons ainsi regardé si des gènes qui étaient D.E dans le contraste NDA.0-ZFU.0 étaient impliqués dans des fonctions mises en évidence dans les 15 contrastes intra-race étudiés précédemment.

Nous avons identifié des gènes DE au sein 13 CanPath parmi lesquelles on retrouve la phosphorylation oxydative, le dysfonctionnement mitochondrial, la voie de Sirtuin et les voies Th1 et Th2. Au sein du contraste ZFU.0-NDA.0, des gènes DE ont été impliqués dans 351

DisFun dont les principales sont liées au fonctionnement cellulaire (mort et survie cellulaire, mouvement cellulaire, signalisation et interaction cellule à cellule, cancer, réponse inflammatoire etc) ou encore liées aux maladies hématologiques.

L'expression des gènes pourrait être influencée par au moins 105 UpStream. Les plus enrichis étaient les cytokines (INFG, IL2, TNF, CSF2, IL4), les facteurs de croissance (TGFB1, HGF), TP53, Vegf ou encore MYC.

Au sein du contraste ZFU.0-NDA.0, 55 gènes DE étaient impliqués dans des fonctions significativement enrichies au cours de l'infection. On en trouve notamment 25 présents dans au moins dix fonctions. Les principaux gènes étaient IL2RA, qui était impliqué dans 276 fonctions, IGF2 dans 142, GATA1 dans 95, GPB2 dans 52 ou encore MARCO dans 58 fonctions.

3 Discussion

La trypanotolérance bovine est un phénotype complexe, multigénique, qui présente une nette différence entre races bovines, mais également une forte variabilité intra-race. Ce phénotype demeure une boîte noire pour la communauté scientifique, même si des éléments émergent des divers travaux qui ont été effectués et que j'ai synthétisés en première partie de ce manuscrit.

Les objectifs de mes travaux étaient de contribuer à la connaissance globale de ce phénotype, en étudiant de nouvelles races bovines, en utilisant le RNA-seq, une méthode plus précise et informative que les outils antérieurs d'étude de l'expression du génome, et en faisant un effort sur l'interprétation biologique des résultats. Depuis le début de mon contrat de Volontaire International (VIA) en 2012, j'ai contribué aux travaux du projet ANR AATTOL, dès l'infection expérimentale et la récolte des phénotypes sur les animaux.

La première partie du projet a porté sur la caractérisation phénotypique de cinq races locales : les taurins N'Dama, Lagunaire et Baoulé, la race métisse Borgou, et la race Zébu peul. Nous avons clairement montré des différences entre les races, les races Lagunaire et N'Dama contrôlant l'anémie induite par l'infection, alors que le Zébu Peul présentait en moyenne une forte anémie, et la Borgou a affiché un phénotype intermédiaire. La race Baoulé était proche de la race Lagunaire et de la race N'Dama, mais légèrement plus anémiée. Les résultats sont détaillés dans l'article de Berthier et al, 2015 (Berthier et al., 2015).

Sur la base des résultats de la caractérisation phénotypique, j'ai pu analyser les données RNA-seq qui ont été produites à partir des échantillons de sang prélevés avant et au cours de l'infection sur les bovins. Dans ce chapitre, je discuterai des résultats globaux de l'analyse du transcriptome, avant de détailler certains gènes qui ont été différentiellement exprimés dans de nombreux contrastes, ou qui ont présenté des variations (en termes de logFC) très importantes, puis d'interpréter les résultats de l'analyse fonctionnelle. Je terminerai enfin par les limites de l'étude, les perspectives qu'elle apporte et une conclusion.

3.1 Observation globale des résultats

L'analyse en composant principale a montré une structuration nette des niveaux d'expression des gènes des différentes banques (cf. partie Résultats), les banques appartenant à une même race et une même date ayant tendance à se regrouper. Elle a montré que l'infection trypanosomienne a eu un impact majeur sur l'expression des gènes des cellules sanguines des bovins. Ce résultat était attendu puisque *T. congolense* est un parasite extracellulaire du sang, en interaction permanente avec les cellules sanguines et également les cellules endothéliales. A noter que les études antérieures ((O'Gorman et al., 2006), (O'Gorman et al., 2009), (Noyes et al., 2011)) n'ont

pas présenté d'analyses multivariées, qui permettent pourtant de valider visuellement l'expérience et d'avoir des informations sur les dynamiques d'expression. Pour rappel, les expériences, la construction des banques RNA-seq et le séquençage ont été organisés de façon à éviter des effets confondants entre de possibles effets de manipulations et l'effet biologique d'intérêt.

L'ACP a également souligné une structuration du transcriptome correspondant à la structuration de la diversité génétique bovine. En effet, la race Zébu Peul d'une part et les races taurines d'autre part se sont différenciées sur l'axe 2 de l'ACP, et la race Borgou a présenté une position intermédiaire. On constate donc des positions similaires à celles qu'on obtient en effectuant une caractérisation génétique à l'aide de marqueurs microsatellites (Moazami Goudarzi et al., 2001) ou de SNPs (Flori et al., 2014). Il existe donc des différences « basales » dans les niveaux d'expression des gènes entre la race Zébu Peul et les races taurines. Ces différences peuvent être neutres, associées à l'histoire démographique des races, et/ou être adaptatives car ces races vivent dans des environnements et des systèmes d'élevage différents (cf. 1.5.3).

L'ACP a montré des évolutions à peu près parallèles des banques des différentes races, ce qui dénote une réponse globalement identique des races à l'infection. L'espoir d'avoir des évolutions divergentes sur le plan de l'ACP était mince vu les éléments de la bibliographie, qui ont du mal à mettre en évidence des différences nettes entre la réponse immunitaire ou le transcriptome des races. Néanmoins, la race NDA a montré le plus grand nombre de gènes D.E., avec une modification précoce du transcriptome. Ce résultat est en accord avec les résultats de (O'Gorman et al., 2009), qui a noté un nombre plus élevé de gènes DE chez la race NDA en comparaison à la race ZFU. En effet, deux études consécutives ((O'Gorman et al., 2006), (O'Gorman et al., 2009)) ont été réalisées afin d'étudier les changements d'expression génique des PBMC (cellules mononuclées du sang périphérique) issues de bovins N'Dama trypanotolérants et de Zébus trypanosensibles infectés expérimentalement par *T. congolense*. Bien que les tissus (sang versus PBMC) et les techniques diffèrent (RNAseq versus qPCR dans ((O'Gorman et al., 2006)) ainsi que microarray et qPCR dans (O'Gorman et al., 2009)), nous avons observé des similarités de réponses, au niveau du sens de variation des gènes DE, entre nos résultats et ces 2 études.

Parmi les gènes DE identifiés comme étant sur-régulés dans nos données et dans (O'Gorman et al., 2006), nous retrouvons l'IL6 (sauf chez BAO) (avec logFC moyen = 3,45, -log10FDR_mean = 3,6) et NFKB1 (avec logFC moyen = 0,31, -log10FDR_mean = 4,3). A l'inverse, l'IL1RN (avec logFC moyen = -0,67, -log10FDR_mean = 2,3) et l'IL8 (ou CXCL8)

(avec logFC moyen = -0,37, -log10FDR_mean = 0,8) ont été identifiés comme étant sous-régulés respectivement, chez toutes les races sauf BOR et pour NDA.40-0.

Nous observons également une différence de réponse entre les races NDA et ZFU au niveau de l'expression de l'IL10. A DPI = 21, (O'Gorman et al., 2006) a observé que l'expression du gène IL10 était significativement 4,3 fois plus élevée chez ZFU que chez NDA (p-value = 0,001). Dans nos données, nous observons un sens de variation similaire puisque l'IL10 a été significativement sur régulée chez ZFU à partir de DPI20 (ZFU.20-0 et ZFU.30-0) mais pas chez NDA.

L'étude menée par (O'Gorman et al., 2009) a permis d'identifier, parmi une liste de 32 gènes, 9 gènes sur-régulés chez l'une des races ou bien chez les 2, ainsi que 14 gènes présentant des profils d'expression qui diminuaient généralement au cours de l'infection chez l'une des races ou bien chez les 2. Parmi les gènes identifiés comme étant sur régulés, on en retrouve 8 qui sont également régulés positivement dans nos données. Un seul de ces 8 gènes est régulé à la hausse pour l'ensemble de nos races, il s'agit de CD19 (avec logFC moyen = 0,87, -log10FDR_mean = 6,3). Parmi les 14 gènes identifiés comme étant sous régulés, 8 gènes étaient également significativement sous régulés dans notre jeu de données. Parmi eux, un seul (TIMP3 avec logFC moyen = -0,68, -log10FDR_mean = 3,3) était significativement régulé à la baisse pour l'ensemble des races.

De plus, nous avons pu observer que, parmi les gènes retrouvés DE dans notre jeu de données et dans ces 2 études, les variations allaient dans le même sens de surexpression ou de sous-expression : aucun gène DE n'a montré des sens de variations divergents entre taurins et Zébu (seul un gène a présenté une différence entre Baoulé et Lagunaire, mais une observation graphique de ce gène a montré une forte variabilité intra-race).

Enfin, même s'il existe une certaine variabilité (au sein de la race, entre les races et entre les expériences), la réponse globale à l'infection à *T. congolense* chez le bovin semble robuste.

3.2 Gènes DE au cours de l'infection

3.2.1 Gènes surexprimés dans tous les contrastes

Au cours de l'infection, six gènes ont été estimés comme significativement surexprimés dans les 15 contrastes intra-race (NR4A1, CCL22, IFI30, CTSZ, KYNU, et IL17REL). Ces gènes sont tous impliqués dans la réponse immunitaire.

NR4A1 appartient à la sous-famille NR4A des récepteurs nucléaires (NR : nuclear receptor) comprenant 3 membres (NR4A1, 2 et 3). Ces derniers sont rapidement induits par un large

éventail de molécules, notamment les acides gras, des signaux de stress et des cytokines (tel que le TNF) et des facteurs de croissance (Maxwell and Muscat, 2006). Des études ont montré que NR4A1 était impliqué dans la régulation du métabolisme du glucose (Chao et al., 2007) mais également dans la régulation de la réponse immunitaire. En effet, il a été mis en évidence qu'il jouait un rôle crucial dans les processus biologiques impliqués dans la survie cellulaire et l'apoptose (Li et al., 2006). Au sein des macrophages résidents (dans les tissus) en charge de la phagocytose des cellules apoptotiques, NR4A1 est fortement exprimé. En contrôlant le développement des cellules Treg, il intervient également comme coordinateur de l'homéostasie tissulaire et permet le maintien de la tolérance immunitaire vis-à-vis des auto-antigènes issus de ces cellules apoptotiques (Ipseiz et al., 2014). Des auteurs ont mis en évidence son rôle en tant qu'inhibiteur essentiel dans la différenciation des cellules Th1 et Th17 (Wang et al., 2018) ainsi qu'en tant que régulateur dans le développement des cellules T CD8⁺ (Nowyhed et al., 2015). Enfin, NR4A1 a été décrit comme étant capable de moduler le phénotype inflammatoire des monocytes et des macrophages ((Hanna et al., 2011), (Hanna et al., 2012)). Il a été montré que chez des souris NR4A1^{-/-} infectées par *T. congolense*, la production de TNF et des lésions hépatiques augmentaient. Les auteurs ont alors suggéré un rôle protecteur du gène NR4A1 (Morias et al., 2015).

La chimiokine CCL22 (C-C motif chemokine 22) est exprimée par les macrophages et les cellules dendritiques matures. La fonction principale de CCL22 semble être l'induction de la migration chimiotactique des lymphocytes T activés de type Th2 principalement, des lymphocytes Treg et des lymphocytes iNKT (invariant natural killer T) par le biais de son récepteur spécifique CCR4 (Ghadially et al., 2005). CCL22 a également un rôle d'inhibiteur dans la prolifération et les fonctions effectrices des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ (Bischoff et al., 2015). Il a été reporté que l'expression de cette chimiokine aurait un effet protecteur dans certaines maladies auto-immunes ((Bischoff et al., 2015), (Elhussein et al., 2016)).

IFI30 est une enzyme thiol réductase lysosomale exprimée de manière constitutive dans des cellules présentatrices d'antigène (CPA) et induite par l'IFN γ dans les autres types cellulaires ((Phan et al., 2000), (Arunachalam et al., 2000)). Elle joue un rôle important dans l'apprêtement de l'antigène au niveau du CMH de classe II.

CTSZ (Cathepsin Z ou X) est une cystéine carboxypeptidase, localisée principalement dans les cellules immunitaires (monocytes, macrophages et cellules dendritiques) régulant leur prolifération, leur maturation, leur migration, leur adhésion ainsi que leur phagocytose ((Kos et

al., 2005), (Kos et al., 2015)). La cathepsine joue notamment un rôle prépondérant dans la maturation des cellules dendritiques (Obermajer et al., 2008).

KYNU (kynuréninase ou L-kynurenine hydroxylase) est une enzyme de la voie du métabolisme du tryptophane, cette dernière étant généralement associée à une suppression immunitaire. KYNU est exprimé par un sous-ensemble de cellules myéloïdes (monocytes, macrophages et cellules dendritiques) ainsi que par d'autres cellules telles que les cellules endothéliales ou encore les kératinocytes. L'expression de cette enzyme est associée à la pathogenèse des maladies inflammatoires de la peau (Harden et al., 2015).

Des études ont montré que les variants du gène IL17REL (Interleukin 17 Receptor E Like) sont associés à des maladies inflammatoires intestinales ((Franke et al., 2010), (Sasaki et al., 2015)). Chez des souris infectées expérimentalement par *T. congolense*, un rôle protecteur de l'IL17 ainsi que des cellules de type TH17 a été montré dans la pathogénie de la maladie (Mou et al., 2010). Cependant, très peu d'informations sont actuellement disponibles sur le rôle précis de la protéine par l'IL17REL.

3.2.2 Gènes surexprimés

Nous avons ensuite identifié des gènes DE possédant des logFC moyens relativement élevés. Parmi eux, nous trouvons des gènes codants pour des sous-unités de l'hémoglobine (HBM avec le logFC moyen le plus fort 6,96, HBA : logFC moy = 4,10 et HBG : logFC moy = 3,32). Des gènes codants pour des protéines de la membrane érythrocytaire GYPB (logFC moy = 4,76), ICAM4 (sur-régulé dans au moins un contraste chez toutes les races sauf BAO et NDA avec logFC moy = 3,16) ainsi que le gène SOX6 (logFC moy = 3,02) impliqué dans l'érythropoïèse et la maturation des cellules érythroïdes (Cantu et al., 2011). Il a été reporté que des souris déficientes en SOX6 étaient anémiées en raison d'une altération de la maturation des globules rouges et présentaient une expression inappropriée du gène de la globine dans les érythrocytes définitifs (Yi et al., 2006). Chez les bovins, dans des conditions normales, i.e. en absence d'anémie, le taux de réticulocytes en circulation dans le sang périphérique est extrêmement bas en comparaison de celui observé chez l'homme. En effet, des auteurs ont montré, à partir de données RNAseq issues du sang périphérique de différentes espèces, que la proportion moyenne de transcrits du gène de l'hémoglobine (présence d'ARNm de globine dérivés de réticulocytes) par rapport au total des gènes exprimés variait de 70 % chez l'homme à 0,17 % chez le bovin (Correia et al., 2018). En cas d'anémie, la moelle osseuse va tenter de régénérer le stock d'hématies en produisant une plus grande quantité de réticulocytes (activité de l'érythropoïèse) qui seront ensuite exporter vers la circulation sanguine. On parle alors de régénération

médullaire. Ces premières observations montrent que, quelle que soit la race, les bovins répondent de façon rapide à l'anémie provoquée par l'infection.

Nous avons également observé, parmi ces gènes DE présentant des logFC élevés, plusieurs gènes impliqués dans la réponse immunitaire. Le gène ARG1 codant pour l'arginase 1 possède le logFC moyen le plus élevé après l'HBM (LogFC moyen de 6,90). Des travaux préliminaires menés *in vivo* sur le modèle murin ont mis en évidence au sein des macrophages de souris infectées, par *T. brucei* (Gobert et al., 2000) ou *T. congolense* (Noel et al., 2002), une activité élevée de l'arginase. Cette activité est plus importante dans les macrophages des souris BALBc sensibles que dans les macrophages des souris C57BL/6 tolérantes (Duleu et al., 2004).

L'induction de la voie de l'arginase, au sein des macrophages, constitue à la fois un mécanisme indispensable à la prolifération des parasites mais également un mécanisme inhibant la production de molécules endogènes antiparasitaires telles que le NO (voir Figure 14 partie 1). En effet, l'oxyde nitrique synthase (iNOS ou NOS II) et l'arginase partagent le même substrat : la L-arginine. Cette dernière peut être oxydée par l'iNOS en NO et citrulline et induire l'activité cytotoxique des macrophages, ou être hydrolysée par l'arginase en urée et ornithine et ainsi permettre la biosynthèse de molécules nécessaires à la croissance des trypanosomes telles que les polyamines ((Fairlamb and Cerami, 1992), (Munder et al., 1999), (Gobert et al., 2000), (Vincendeau et al.), (De Muylder et al., 2013)).

De plus, il a été montré qu'il existe une compétition réciproque entre l'activation de l'iNOS et de l'arginase vis-à-vis du substrat et que la balance entre ces 2 enzymes est régulée de manière compétitive par la balance des cytokines de type Th1 et Th2 (Modolell et al., 1995). Ainsi, des auteurs ont reporté que, chez la souris, ARG1 joue un rôle important dans la réponse immunitaire et que l'expression de ce gène est associée à une réponse anti-inflammatoire avec une polarisation des macrophages de type M2 (voie alternative) par opposition aux macrophages de type M1 (voie classique) pro-inflammatoires produisant du NO ((Mills et al., 2000), (Murray and Wynn, 2011)). Enfin, une étude récente a mis en évidence, chez des souris infectées expérimentalement par *T. congolense*, que les cellules MDSC (Myeloid-derived suppressor cells) inhibent la prolifération des cellules T CD4 + et fonctionnent de manière dépendante de l'arginase-1, affaiblissant ainsi le contrôle efficace des parasites par le système immunitaire de l'hôte (Onyilagha et al., 2018). Finalement, l'expression de l'ARG1 semblerait favoriser le parasite (production de facteurs de croissance et inhibition de la production de NO), mais pourrait également contribuer à modérer une réponse immunitaire inflammatoire délétère pour

l'hôte. Dans notre jeu de données, l'ARG1 est surexprimée quelle que soit la race et ne serait donc pas associée à la trypanotolérance bovine.

Parmi les gènes sur-régulés impliqués dans la réponse immunitaire, on trouve également CCL2 (sur-régulé de façon significative seulement chez BOR et LAG), CSTB et MARCO (chez toutes les races sauf ZFU), IL6 (significatif dans au moins 2 contrastes chez toutes les races sauf chez BAO), MME, MMP14, MAPK11 et MAPK12 (sur-régulés chez toutes les races).

Des études visant à étudier les changements d'expression géniques des PBMC, issues de bovins N'Dama et Zébu Boran infectés par *Trypanosoma congolense*, ont permis de mettre en évidence que l'expression de l'ARNm de l'IL6 a augmenté dans les PBMC des deux races bovines et que cette augmentation a eu lieu de manière plus précoce chez la race ZFU ((Mertens et al., 1999), (O'Gorman et al., 2006)). Il a été reporté dans les cas de trypanosomiase humaine africaine due à *T. brucei gambiense*, un taux élevé d'IL6 dans le plasma d'individus asymptomatiques séropositifs (Ilboudo et al., 2014) et dans le liquide cérébro-spinal de patients atteints de la maladie du sommeil par *T. b. gambiense* (Lejon et al., 2002). Les individus séropositifs développent des réponses sérologiques spécifiques de longue durée alors que les résultats des examens microscopiques sont négatifs (Ilboudo et al., 2014). Il semblerait ainsi que l'expression de l'IL6 est un rôle dual, plutôt associé à l'asymptomatisme (qu'on pourrait assimiler à la trypanotolérance) chez l'homme, alors qu'elle serait associée à la susceptibilité chez le bovin.

Ce rôle ambigu de l'IL6 est reporté dans la bibliographie dans d'autres contextes. L'IL-6 est une cytokine soluble pléiotrope rapidement produite et de façon transitoire en réponse à des infections et à des lésions tissulaires. Elle possède des fonctions à la fois pro-inflammatoires et anti-inflammatoires qui affectent des processus allant de l'immunité à la réparation des tissus et au métabolisme (Arango Duque and Descoteaux, 2014). De ce fait, elle contribue à la défense de l'hôte en stimulant les réponses en phase aiguë, l'hématopoïèse et les réactions immunitaires (Tanaka et al., 2014). Considérée principalement comme une cytokine pro-inflammatoire impliquée notamment dans le recrutement et la différenciation des cellules immunitaires (cellules B et T), il a été montré que l'IL6 a également de nombreuses activités régénératrices ou anti-inflammatoires et que sa fonction dépend des cytokines présentes dans l'environnement, notamment l'IL4 (Casella et al., 2016) mais également des récepteurs avec lesquels elle interagit induisant ainsi une signalisation cellulaire pro ou anti-inflammatoire ((Scheller et al., 2011), (Hurst et al., 2001)). Dans nos données, l'IL6 est sur-régulée de manière significative chez toutes les races (sauf BAO) particulièrement chez ZFU tandis que ses récepteurs IL6R et IL6ST sont sous-régulés.

CCL2 (Chemokine (C-C motif) ligand 2 ou Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP1)) est une cytokine de type chimiokine, produite par de nombreux types cellulaires et principalement par les monocytes/macrophages (Deshmane et al., 2009). Elle constitue un puissant facteur chimiotactique pour les monocytes (Kanda et al., 2006) et favorise, dans des conditions non inflammatoires, l'émigration homéostatique de monocytes de la moelle osseuse vers la circulation sanguine (Yadav et al., 2010). CCL2 régule également la migration et l'infiltration des lymphocytes T mémoire (Carr et al., 1994), des cellules NK (Natural Killer) (Maghazachi et al., 1994) ainsi que des cellules dendritiques aux sites de lésions tissulaires et d'infection (Xu et al., 1996). Des auteurs ont constaté une augmentation des niveaux de protéine CCL2 dans le sang et de l'expression génique de CCL2 dans le foie de souris tolérantes C57BL/6 infectées par *T. brucei* (Bosschaerts et al., 2010). Une autre étude menée sur des souris sensibles BALB/c et tolérantes C57BL/6 infectées par *T. congolense* a permis de mettre en évidence une sécrétion accrue de CCL2 au stade avancé de l'infection. Les auteurs suggèrent alors le rôle potentiel de cette chimiokine dans les processus anti-inflammatoires des macrophages activés (Noel et al., 2002). Néanmoins, comme l'IL6, il a été montré que son action pouvait avoir un double rôle en exerçant à la fois des actions pro et anti-inflammatoires et que cela dépendait des récepteurs avec lesquels CCL2 interagissait (Deshmane et al., 2009).

MAPK11 et MAPK12 appartiennent à la superfamille des protéines kinases activées par un mitogène (MAP kinase ou Mitogen-activated protein kinase) et plus spécifiquement à l'un des 5 sous-groupes qui la compose : les MAP kinases p38. Elles sont ainsi impliquées dans de nombreux processus de la vie cellulaire tels que la prolifération cellulaire, la différenciation cellulaire ou encore la mort cellulaire (Roux and Blenis, 2004). Le comportement cellulaire, en réponse à des stimuli extracellulaires, est induit par des voies de signalisation intracellulaires telles que les voies MAP kinases (Zarubin and Han, 2005). Ces signaux externes sont très hétérogènes et impliquent entre autre le stress osmotique, le choc thermique ou encore des cytokines inflammatoires telles que le TNF ou l'IL1 ((Rouse et al., 1994), (Freshney et al., 1994), (Raingeaud et al., 1995)). Il a été montré que MAPK12 était activé dans les lignées de cellules myéloïdes murines en réponse aux lipopolysaccharides (LPS) et était impliqué dans le contrôle de l'expression des cytokines (TNF α , IL1 β , IL10 et IL12) (Risco and Cuenda, 2012). Le rôle des autres protéines est moins connu.

MMP14 (Matrix metalloproteinase-14) appartient à la famille multigénique des métalloprotéinases de la matrice (MMP), grande famille d'endopeptidases sécrétées ou liées à la membrane et caractérisées par leur capacité à cliver les composants de la matrice extracellulaire ((Geurts et al., 2011), (Aguirre et al., 2017)). Elles sont également capables d'agir sur un spectre

de substrats beaucoup plus large tels que des peptides antimicrobiens, des protéines d'adhésion, des récepteurs, des hormones, des cytokines ou encore des chimiokines régulant ainsi les réponses immunitaires ((Sternlicht and Werb, 2001), (Geurts et al., 2011)). Actuellement, ces enzymes sont identifiées comme étant des régulateurs clés de la réponse inflammatoire en intervenant dans des phénomènes de réparation des tissus, dans la défense des muqueuses ainsi que dans l'inflammation et l'immunité acquise (Parks et al., 2004). L'expression de la plupart de ces métallo-protéinases matricielles est régulée de manière transcriptionnelle par des facteurs de croissance, des hormones, des cytokines et ou encore des transformations cellulaires (Nagase and Woessner, 1999). Il a été montré, à la suite d'une stimulation avec du LPS, que les souris mutantes MMP14^{-/-} succombaient plus rapidement à la septicémie. Les auteurs ont pu mettre en évidence notamment le rôle anti-inflammatoire de cette enzyme (Aguirre et al., 2017).

MME (membrane metallo-endorpeptidase) connu également sous le nom de cluster de différenciation CD10, est une endopeptidase trouvée principalement dans les cellules lymphoïdes B humaines immatures. CD10 est d'une importance primordiale car il s'agit d'un progéniteur lymphoïde commun (CLP) des stades précoces de la différenciation des cellules B ((Loken et al., 1987), (Mishra et al., 2016)).

Enfin, deux gènes ont été retrouvés comme étant significativement sur-régulés chez toutes les races sauf pour la race ZFU : MARCO (trouvé également comme étant différentiellement exprimé avant l'infection entre ZFU et AFT) et CSTB (présentant une grande variabilité dans la dynamique d'expression chez les bovins ZFU).

MARCO (Macrophage Receptor or Macrophage Receptor With Collagenous Structure) est un récepteur (scavenger receptor ou SR) de reconnaissance de formes (Pattern Recognition Receptor ou PRR) de classe A qui se trouve à la surface des macrophages et fait partie du système immunitaire inné ((Gough and Gordon, 2000), (Kraal et al., 2000)). Les « scavenger receptor » constituent une grande famille de glycoprotéines transmembranaires à la surface des cellules et sont principalement exprimés dans les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules endothéliales ((Murphy et al., 2005), (Bowdish and Gordon, 2009)). A l'origine, ces récepteurs sont caractérisés par leur capacité à reconnaître et à internaliser les lipoprotéines de basse densité (LDL) modifiées, telles que les LDL oxydées et les LDL acétylées. L'internalisation de ces LDL facilite ainsi leur dégradation au sein des macrophages (Goldstein et al., 1979). MARCO est capable de se lier à divers agents pathogènes afin de faciliter leur phagocytose et d'activer les réponses immunitaires ((Arredouani et al., 2004), (Bowdish and Gordon, 2009), (Thuong et al., 2016)).

Des découvertes récentes, soutenant le rôle immunologique de MARCO dans les infections chez l'homme, indiquent que les polymorphismes (SNP) au niveau de ce récepteur sont associés à une susceptibilité accrue à la tuberculose pulmonaire chez l'homme, maladie infectieuse courante et souvent mortelle ((Benard et al., 2014), (Bowdish et al., 2009)).

Enfin, CSTB (Cystatin B) est une cystatine endogène localisée dans le cytosol et le noyau des macrophages de souris (Maher et al.). Cette protéine réduit l'activité (inhibe) des enzymes cathepsines, protéines jouant un rôle dans la décomposition de certaines protéines dans les lysosomes. Il a été montré que son expression augmente au sein des macrophages stimulés par le LPS et l'IFN γ . De plus, il semblerait qu'elle soit impliquée dans le contrôle de l'inflammation en empêchant notamment la génération de superoxyde dans les mitochondries (Maher et al., 2014).

Les gènes sur-exprimés, et notamment les six gènes DE dans tous les contrastes intra-races, sont notamment associés à la réponse immunitaire, et particulièrement exprimés par les macrophages ou les cellules dendritiques, avec des propriétés anti-inflammatoires (i.e. NR4A1, ARG1, MMP14), pro-inflammatoires (MAPK12, MARCO), ou doubles (IL6, CCL2). Des gènes liés à la production accrue érythrocytes sont également sur-exprimés, en compensation de l'anémie induite par l'infection.

3.2.3 Gènes sous-exprimés

Nous avons également identifié des gènes DE possédant des logFC moyens négatifs, signifiant donc une sous-expression par rapport à DPI.0. Parmi eux, nous trouvons CYP17A1, CRTAC1, ELANE, DAB2, ACAN, BPI, CMA1, MS4A2, SFRP1, IGFBP1, RNASE1, CSPG4, LIF ou encore GATA2

CYP17A1 fait partie de la superfamille du cytochrome P450. Ce gène est exprimé de manière omniprésente dans de nombreux tissus et types de cellules et code pour une enzyme du type hydroxylase. Les protéines du cytochrome P450 sont généralement considérées comme des molécules catalysant de nombreuses réactions impliquées dans le métabolisme et la synthèse du cholestérol, des stéroïdes et ainsi que d'autres lipides (Yoshimoto and Auchus, 2015).

BPI et ELANE sont principalement exprimés par les neutrophiles et participent à la défense antimicrobienne. ELANE (Elastase, Neutrophil Expressed) appartient à une sous-famille de protéases à sérine qui hydrolysent de nombreuses protéines. Cette protéase hydrolyse les protéines au sein des lysosomes de neutrophiles spécialisés, appelés granules azurophiles ainsi que des protéines de la matrice extracellulaire. Elle joue un rôle prépondérant dans la dégradation des protéines membranaires et des facteurs de virulence de nombreuses bactéries et

est également impliquée dans l'inflammation (Nayak et al., 2015). BPI (Bactericidal Permeability Increasing Protein) code pour une protéine de liaison au lipopolysaccharide. Cette protéine se trouve de façon abondante dans les granules primaires des neutrophiles et, dans une moindre mesure, dans les éosinophiles, les fibroblastes et certaines cellules épithéliales des muqueuses. Elle est particulièrement active dans la destruction et l'élimination des bactéries gram négatives et dans la neutralisation des endotoxines (Schultz et al., 2007).

MS4A2 (Membrane Spanning 4 -Domains A2) et CMA1 (Chymase) sont exprimés dans les mastocytes. Les fonctions de ces deux gènes sont toutefois différentes. MS4A2 code pour la sous-unité bêta du récepteur IgE présent à la surface des mastocytes et des basophiles. Il intervient dans la réponse allergique (liaison de l'allergène à l'IgE liée au récepteur) et il a été montré qu'il joue un rôle d'amplificateur des réponses des mastocytes précoces et tardifs pouvant ainsi conduire, *in vivo*, à des réponses anaphylactiques (Dombrowicz et al., 1998). CMA1 (Chymase) code pour une sérine protéase chymotryptique. Elle est notamment impliquée dans la dégradation de la matrice extracellulaire ainsi que de certains facteurs de virulence mais également dans la régulation de l'inflammation (Roy et al., 2014).

IGFBP1 (Insulin-like growth factor-binding protein 1) code pour une protéine de liaison au facteur de croissance analogue à l'insuline et régule l'activité cellulaire de différentes manières à savoir la motilité et l'adhésion cellulaires, l'apoptose ou encore le cycle cellulaire (Firth and Baxter, 2002).

RNASE1 (Ribonuclease pancreatic) code pour un membre des ribonucléases sécrétoires de type pancréatique, un sous-ensemble de la superfamille des ribonucléases A. Cette protéine est exprimée par les cellules endothéliales et contribue à l'homéostasie vasculaire. Il a notamment été montré que son activité pouvait être associée la baisse par des cytokines de type pro inflammatoires telles que le TNF- α (Gansler et al., 2013).

GATA2 appartient à la famille des facteurs de transcription de type GATA et est exprimé par diverses cellules notamment les cellules érythroïdes et endothéliales (Dorfman et al., 1992). La protéine codée joue un rôle essentiel dans la régulation de la transcription des gènes impliqués dans le développement et la prolifération des lignées de cellules hématopoïétiques et endocrines.

CSPG4 (Chondroïtin sulfate proteoglycan 4) code pour un protéoglycane intervenant dans la prolifération et la migration cellulaires. Le rôle de CRTAC1 (Cartilage Acidic Protein 1) et Acan a été mis en évidence dans le cartilage. Ces gènes codent pour des composants principaux de la matrice du cartilage (Hauer et al., 2017). A ce jour, il semblerait qu'aucun lien n'ait été établi entre ces gènes et leur implication dans les interactions hôte*pathogène.

DAB2 (Clathrin Adaptor Protein) est une protéine adaptatrice dont les rôles sont multiples. Elle est notamment impliquée dans la signalisation, l'endocytose, l'adhésion cellulaire, la différenciation des cellules hématopoïétiques, l'angiogenèse et particulièrement dans le contrôle de l'homéostasie cellulaire. Dans le système immunitaire, DAB2 est nécessaire pour le fonctionnement des cellules T régulatrices (Treg). De plus, il a été montré que, dans les cellules dendritiques et les macrophages, DAB2 pouvait être un régulateur intrinsèque négatif de la fonction immunitaire et de l'inflammation ((Ahmed et al., 2015), (Hung et al., 2016)).

LIF (Leukaemia Inhibitory Factor) est une cytokine pléiotrope exprimée par les cellules T, en particulier par les cellules T CD4⁺ humaines et les cellules Treg chez la souris. Elle appartient à la superfamille de l'IL-6 et, est connue pour être antagoniste à cette dernière ((Yue et al., 2015), (Metcalf, 2011)). Il est intéressant de constater, qu'au sein de nos données, LIF est sous régulé alors, qu'à l'inverse, l'IL6 est sur-régulé.

Parmi les gènes sous-exprimés, plusieurs sont normalement exprimés par les granulocytes et les mastocytes : ceci pourrait refléter une inhibition de ces types cellulaires ou une diminution de leur concentration. La sous-expression de certains gènes, comme DAB2, peut, quant à elle, correspondre à une activation d'autres types cellulaires, comme les cellules dendritiques. Enfin, la fonction de certains gènes demeure méconnue ou leur implication dans la réponse immunitaire ou des interactions hôtes*parasites n'a pas été décrite jusqu'à présent.

A l'issue de cette exploration de gènes DE, il apparaît évident qu'une analyse individuelle i.e. gène par gène n'est pas envisageable et ce, pour deux raisons majeures. La première raison est, sans doute, d'ordre pratique. En effet, les listes de gènes DE sont beaucoup trop importantes (certaines contenant des milliers de gènes DE) pour effectuer des recherches bibliographiques approfondies et exhaustives. La deuxième raison, et probablement la plus importante, réside dans le fait, qu'en ne travaillant que sur ces listes, il est impossible d'évaluer les interactions existantes entre les différents gènes ou familles de gènes mais également d'identifier les voies biologiques mises en œuvre par les différentes races au cours de l'infection.

L'analyse fonctionnelle, grâce à l'utilisation du logiciel IPA, nous a permis non seulement d'enrichir nos listes de gènes DE afin de rechercher quelles sont les fonctions biologiques, les voies de signalisation ou encore les molécules régulatrices en amont qui pourraient être associées à la trypanotolérance mais également de prédire si ces régulateurs sont activés ou inhibés. De

plus, cette analyse rend possible l'identification de molécules régulatrices en amont. En effet, certaines molécules peuvent ne pas être mesurables directement dans les données RNA-seq car produites dans un autre tissu que le sang (par exemple le foie ou encore la rate) ou à un moment différent de la date d'échantillonnage.

3.3 Analyse fonctionnelle

3.3.1 Différences basales entre les races

L'interprétation fonctionnelle des gènes DE entre les diverses races et la race Zébu (qui a été choisi en référence) n'a pas fait ressortir des résultats facilement interprétables.

De façon surprenante, l'analyse fonctionnelle a révélé plus de fonctions enrichies entre la Borgou et le ZFU qu'entre les races taurines et la race ZFU. Seul un UpStream, BSG, a été retrouvé comme enrichi dans plusieurs contrastes (LAG.0-ZFU.0, BAO.0-ZFU.0 et BOR.0-ZFU.0). Ce régulateur n'a pas ensuite été retrouvé dans les contrastes intra-races. Les p-values associées aux fonctions ou aux régulateurs enrichis ont été au maximum de 10^{-4} , à des niveaux bien moindre que les enrichissements obtenus lors des contrastes intra-races.

3.3.2 Réponse immunitaire

De nombreuses fonctions associées à la réponse immunitaire ainsi qu'au développement et à la fonction du système hématologique ont été enrichies de manière importante au cours de l'infection.

Nous avons identifié, quelle que soit la race, des fonctions fortement inhibées à DPI30 et DPI40, et relatives aux fonctions cellulaires notamment homéostasie des cellules sanguines, homéostasie des lymphocytes, le développement et la prolifération des cellules T, mouvements des cellules du système lymphatique. En parallèle, des CanPath liés aux fonctions des cellules T telles que les voies Th1 et Th2 ou encore la signalisation iCOS-iCOSL dans les cellules T Helper ont également été trouvées comme étant inhibées. Plusieurs gènes exprimés par ces mêmes cellules ont également été trouvés comme étant sous exprimés. C'est le cas du cluster de différenciation CD3 (CD3D, CD3E et CD3G) qui constitue un complexe protéique membranaire des récepteurs des lymphocytes T (TCR), CD4 qui est une glycoprotéine qui sert de corécepteur des cellules T restreintes au CMH de classe II i.e. aux cellules présentatrices d'antigènes (CPA)), CD8 (CD8A et CD8B) qui, de la même façon que CD4, sert de corécepteur mais s'exprimant à la surface des cellules T restreintes au CMH de classe I ou encore CD25 (ou IL2RA) qui est un récepteur de haute affinité à l'IL2. L'IL2, en tant qu'UpStream était significativement inhibée à DPI.30 chez NDA, LAG et ZFU et à DPI.40 chez BAO et BOR. L'IL2 a également été évaluée

comme étant sous-réglée au sein des PBMC issues de bovins NDA et ZFU infectés expérimentalement par *T. congolense* (O'Gorman et al., 2006). Ces observations vont dans le même sens que des études précédentes qui mettaient en avant le fait que l'immunosuppression était une caractéristique relativement bien documentée et qu'elle se manifestait par une réponse proliférative réduite des cellules T chez le bovin, la souris ou encore chez l'homme ((Mansfield, 1990), (De Baetselier, 1996), (Taylor, 1998), (Uzonna et al., 1998), (Taylor and Mertens, 1999), (Boda et al., 2009)).

Une altération de la fonction des lymphocytes T dans le sang périphérique (PBMC), la rate et, en particulier, dans les ganglions lymphatiques a été mise en évidence chez des bovins de race Zébu infectés par *T. congolense*. Les auteurs ont observés une diminution de la réponse proliférative en réponse à la Con A ((Flynn and Sileghem, 1991), (Lutje et al., 1996)). De plus, il a été mis en évidence que les cellules ganglionnaires de bovins infectés étaient incapables de sécréter *in vitro* de l'IL2 et que l'expression de l'IL2RA été altérée (Sileghem and Flynn, 1992).

Le CD3 en tant que UpStream a été trouvé comme étant activé à DPI.20-0 (voir Figure 46), alors que son expression mesurée par RNA-seq a montré une sous-expression. Le TCR a, quant à lui, été observé comme étant activé à DPI.20-0 puis ensuite inhibé au cours de l'infection. Le complexe TCR est nécessaire pour générer le signal d'activation des lymphocytes T. Ces résultats peuvent paraître surprenants, mais il faut bien distinguer l'expression estimée du CD3 par RNA-seq de ses possibles actions en aval au niveau protéique, estimées par l'analyse réalisée avec IPA, et du décalage temporel associé.

En effet, des études ont montré que l'expression de certains gènes CD3 peut être régulée négativement en cas d'activation des cellules T par les cellules présentatrices d'antigènes ou par un autre stimulus ((Paillard et al., 1990), (Badran et al., 2005), (Krishnan et al., 2001)). Chez l'homme, (Paillard et al., 1990) a montré qu'il existe une modulation à la baisse des ARNm codants pour les récepteurs des lymphocytes T mais également CD4 et CD8 et qu'elle résulte de contrôles de régulation précoces nécessaire pour contrôler l'activation des cellules T. (Krishnan et al., 2001) a suggéré que les cellules T présentant une diminution de l'expression de CD3z pourraient être une caractéristique de l'activation chronique des cellules T.

Les trypanosomes ont la capacité de survivre pendant un temps relativement long chez l'hôte qu'ils infectent notamment grâce leur grande capacité de variation antigénique ((Jackson et al.,

2012), (Matthews et al., 2015)). Il se pourrait donc que la capacité de l'organisme à réduire l'expression des gènes CD3 et TCR soit, en quelque sorte, un moyen de se protéger afin d'éviter un emballement de la réponse immunitaire via une sur activation des lymphocytes T en réponse au parasite qui inonde l'hôte de nouveaux antigènes de surface. Une sous-régulation de l'expression des CD3, mesurée en RNA-seq, pourrait être la résultante de leur activation en tant que corécepteur protéique, estimée par IPA. Ce résultat souligne en tout cas la complexité des boucles de régulation inhérente à la réponse immunitaire.

À ce propos, une balance de la réponse immunitaire est observée dans le modèle murin. En effet, chez la souris, le passage d'une réponse pro-inflammatoire précoce, basée sur des macrophages activés de type M1 (associés à $\text{IFN}\gamma$, IL1, IL6, TNF et à la production de NO), à une réponse anti-inflammatoire, basée sur des macrophages activés de type M2 (associés à IL10, IL4, IL10, IL13 et ARG1) semble conférer à l'hôte une meilleure capacité de survie (Baetselier et al., 2001). De plus, des auteurs suggèrent que l'immunité protectrice de l'hôte (souris) contre *T. congolense* dépend de manière critique de l'action combinée des médiateurs et effecteurs pro-inflammatoires tels que l' $\text{IFN}\gamma$, le TNF ou encore le NO (Magez et al., 2006).

En effet, lors d'une infection à *T. congolense*, une réponse inflammatoire trop faible (qui a été validée par des expériences de knockout sur plusieurs gènes $\text{INF}\gamma\text{R}$, iNOS, TNF) entraîne, chez des souris C57Bl/6, une durée de vie plus courte et une parasitémie plus importante que chez les souris sauvages (Wild Type) ((Magez et al., 2006), (Magez et al., 2007)). Inversement, une réponse pro-inflammatoire trop longue ou trop intense peut avoir des effets délétères sur l'organe où elle siège et potentiellement entraver sa fonction. Il a été mis en évidence, que chez les souris infectées par *T. congolense*, les macrophages pro-inflammatoires maintenus augmentaient les lésions hépatiques et entraînaient un syndrome de réponse inflammatoire systémique ((Morias et al., 2015), (Stijlemans et al., 2014)).

Chez le bovin, contrairement au modèle murin, une telle dichotomie dans la réponse immunitaire n'a pas été mise en évidence. Au cours d'une infection par les trypanosomes, aucune activation de la production de NO et d'iNOS n'a été observée que ce soit chez la race tolérante ((Taylor, 1998)) ou chez la race sensible (Taylor et al., 1996a)).

Les gènes DE au sein de nos données et associés à la réponse immunitaire semblent être principalement associés aux cellules myéloïdes (monocytes, macrophages et cellules dendritiques), comportant à la fois des aspects pro-inflammatoires et anti-inflammatoires. Il a été montré que les macrophages de type M2 possèdent trois phénotypes particuliers, à savoir, M2a, M2b ou M2c (Arango Duque and Descoteaux, 2014).

Parmi les gènes sur régulés, nous avons identifié que l'IL6 est associée à la fois à des macrophages de type M1 et M2 chez la souris, IL10 (M2), CCL22 (M2a), ARG1 (M2a, M2c), CD40 (M1, M2), CFB (M1), MARCO (M1), PTGS2 (M1), CD83 (M2), MYC (M2) ((Arango Duque and Descoteaux, 2014), (Jablonski et al., 2015)), tandis que l'expression de l'IL16 diminuait dans notre ensemble de données mais également dans les macrophages activés (Jablonski et al., 2015).

L'IL1B, codant pour une cytokine pro inflammatoire, a été régulée de façon négative au sein de nos données à DPI30 pour la race ZFU et à DPI40 pour la race NDA et BAO.

Ces résultats montrent, de façon assez subtile, que les deux types de populations de macrophages (M1 et M2) semblent coexister puisqu'on retrouve des gènes associés aux deux principaux types macrophagiques, par exemple MARCO plutôt associés aux M1 et ARG1, marqueur des macrophages de type M2. Cela illustre bien la complexité de la régulation de la réponse immunitaire et qu'il existe des voies qui interagissent pour former un phénotype complexe, voire mélangé (Martinez and Gordon, 2014).

D'ailleurs, l'analyse fonctionnelle révèle que plusieurs UpStream, notamment TNF, IL2 ou encore le TGFB1 ont été activés en début d'infection (DPI20) puis inhibés lors de la phase chronique de l'infection (DPI40). Le TCR suit un profil similaire puisqu'on le retrouve comme étant activé à DPI20 pour ZFU et NDA puis semble être plutôt inhibé pour NDA.40-0. Ces observations laissent penser qu'une réponse similaire à celle observée chez la souris se produit vraisemblablement, avec une phase inflammatoire modulée par une phase de contrôle de cette inflammation. Ceci est notamment illustré par la dynamique du TNF, à savoir, une activation de la réponse immunitaire de type pro inflammatoire puis une tendance à commuter vers une réponse anti-inflammatoire.

A l'inverse des fonctions associées aux cellules T, les fonctions et les voies associées à la réponse de type humorale telles que la quantité d'Ig, la signalisation des récepteurs des cellules B, la signalisation PI3K dans les lymphocytes B ont été activées. Ces observations sont cohérentes avec une autre caractéristique majeure de la trypanosomose qui a été mise en avant dans des études antérieures, à savoir, une activation polyclonale accrue des cellules B ainsi qu'une expansion suivie de la production d'anticorps chez le bovin ((Pinder et al., 1988), (Reinitz and Mansfield, 1990), (Naessens and Williams, 1992), (Taylor et al., 1996b), (Taylor et al., 1998), (O'Gorman et al., 2009)), chez la souris (Onyilagha et al., 2015) et chez l'homme ((Boda et al., 2009), (Lejon et al., 2014)). La réponse anticorps, en particulier la production d'IgG de type 1, semble jouer un rôle essentiel dans la neutralisation des toxines et autres produits dérivant du parasite chez le bovin ((Authié et al., 1993b), (Taylor et al., 1996b), (Taylor

et al., 1998)) et pour la destruction des parasites chez la souris ((Magez et al., 2006), (Magez et al., 2008)). Dans nos données, plusieurs gènes (FCGR1A, FCGR2B, FCGRT) ont été régulés positivement et codent pour des récepteurs pour le fragment cristallisable (Fc) des immunoglobulines de type IgG (Kaetzel, 2014).

Au sein de nos données, nous n'observons malheureusement pas de réponses très différentes entre les races tolérantes et la race sensible. Cela s'explique notamment par le fait que, pour être efficace, la réponse immunitaire doit être modulée et subtile afin de permettre une élimination efficace des parasites sans endommager les tissus de l'hôte infecté. De plus, il nous est impossible de savoir, avec notre jeu de données, si cette dynamique de réponse est due à une immunosuppression provoquée par le trypanosome ou s'il s'agit d'une composante de l'équilibre hôte * parasite (Taylor et al., 1998) nécessaire afin d'éviter une réponse inflammatoire trop importante et délétère. Nous observons toutefois des différences qui semblent être liées à la cinétique et à l'intensité de réponse à l'infection.

Ainsi, si l'on devait répondre à la question posée dans le titre de la revue de (Taylor, 1998) « Immune response of cattle to trypanosomosis : protective or pathogenic ? », la réponse serait sans doute la même qu'il y a 20 ans, probablement les deux !

3.3.3 Métabolisme

Les résultats obtenus ont mis en évidence un enrichissement important des voies biologiques associées au métabolisme et notamment à la biosynthèse des stérols et du cholestérol ainsi qu'à la gluconéogenèse. Ces voies sont identifiées par IPA comme étant hautement activées. Cette observation suggère donc une activité accrue de ces voies indiquant probablement une production élevée de lipides par les cellules de l'hôte. Par ailleurs, de nombreux « upstream regulators » associés au métabolisme ont également été enrichis. Certains d'entre eux ont été identifiés comme étant activés (INSR, SREBF1, SREBF2, SCAP) et d'autres inhibés (HDL-cholestérol, CYP51A1, POR, INSIG1, INSIG2). Le Tableau 12 récapitule les fonctions biologiques enrichies et liées au métabolisme des lipides.

Tableau 12 : Récapitulatif des valeurs obtenues par catégories pour le cholestérol

(DF et CP : valeur de B-H value, Upstream regulator : valeur de p-value)

Diseases.or.Functions.Annotation	NDA.20-0	NDA.30-0	NDA.40-0	ZFU.20-0	ZFU.30-0	ZFU.40-0	LAG.20-0	LAG.30-0	LAG.40-0	BAO.20-0	BAO.30-0	BAO.40-0	BOR.20-0	BOR.30-0	BOR.40-0
Metabolism of cholesterol	3.6	0.0	0.0	10.5	3.8	4.1	0.0	0.0	0.0	0.0	6.8	2.4	2.1	2.8	0.0
Synthesis of cholesterol	3.4	0.0	0.0	9.9	3.1	3.1	0.0	0.0	0.0	0.0	7.2	2.7	1.4	3.5	0.0
Homeostasis of cholesterol	1.6	0.0	0.0	3.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Canonical Pathways	NDA.20-0	NDA.30-0	NDA.40-0	ZFU.20-0	ZFU.30-0	ZFU.40-0	LAG.20-0	LAG.30-0	LAG.40-0	BAO.20-0	BAO.30-0	BAO.40-0	BOR.20-0	BOR.30-0	BOR.40-0
Superpathway of Cholesterol Biosynthesis	5.4	2.0	0.8	21.9	7.2	5.0	0.4	2.3	0.2	0.0	11.7	4.8	2.2	6.8	1.1
Cholesterol Biosynthesis I	2.0	0.6	0.3	10.2	5.4	2.9	0.3	1.2	0.0	0.0	5.9	2.7	0.5	3.8	0.3
Cholesterol Biosynthesis II (via 24, 25-dihydrolar	2.0	0.6	0.3	10.2	5.4	2.9	0.3	1.2	0.0	0.0	5.9	2.7	0.5	3.8	0.3
Cholesterol Biosynthesis III (via Desmosterol)	2.0	0.6	0.3	10.2	5.4	2.9	0.3	1.2	0.0	0.0	5.9	2.7	0.5	3.8	0.3
LXR/RXR Activation	1.0	0.2	0.5	6.4	2.7	5.1	0.2	0.5	0.3	1.4	4.1	2.6	1.1	1.8	0.5
Upstream regulator	NDA.20-0	NDA.30-0	NDA.40-0	ZFU.20-0	ZFU.30-0	ZFU.40-0	LAG.20-0	LAG.30-0	LAG.40-0	BAO.20-0	BAO.30-0	BAO.40-0	BOR.20-0	BOR.30-0	BOR.40-0
PPARA	16.5	4.6	2.3	21.0	7.4	4.1	6.4	4.9	0.0	2.1	9.8	2.2	13.1	11.5	3.2
SCAP	8.9	2.9	3.4	24.9	13.6	8.6	2.1	5.2	0.8	0.0	14.3	8.9	5.8	8.1	3.2
POR	9.4	2.6	2.7	23.0	8.8	8.8	3.7	3.2	1.8	0.0	13.0	7.1	6.8	8.1	2.7
SREBF2	9.4	3.5	2.3	23.7	10.6	8.8	1.9	5.2	0.7	0.0	13.0	7.5	6.3	8.5	3.1
INSIG1	5.9	2.5	1.9	20.9	11.6	7.3	2.4	3.2	0.0	4.0	12.8	5.9	6.3	8.3	4.0
SREBF1	7.1	2.3	2.3	24.8	14.2	11.2	1.6	5.7	1.5	3.8	12.4	6.6	6.4	7.4	3.1
INSR	14.7	8.7	6.5	13.6	9.5	4.1	1.9	4.4	0.4	0.0	4.7	4.6	3.9	4.0	2.0
PTEN	8.1	7.6	6.7	9.3	8.5	4.1	1.8	5.4	0.0	2.0	5.4	4.9	8.4	4.5	3.7
cholesterol	4.7	1.8	1.3	20.7	6.1	7.6	1.8	2.5	2.0	2.2	10.4	5.2	4.3	3.4	1.9
CYP51A1	2.6	0.8	1.4	12.5	5.5	4.6	0.0	2.6	0.0	0.0	6.8	3.6	0.0	5.2	0.0
MFSD2A	5.9	0.0	0.0	14.9	5.9	4.4	0.0	2.4	0.0	2.8	7.6	3.6	0.0	3.3	0.0
ATP7B	10.1	3.8	2.4	16.4	5.2	4.2	1.8	4.5	0.0	0.0	7.6	3.0	4.7	5.0	0.6
ADRB	7.6	2.5	2.3	10.1	7.5	5.9	2.8	2.5	0.0	2.4	7.1	1.9	4.9	3.7	2.4
INSIG2	4.1	1.5	2.0	11.9	4.6	4.9	0.0	2.8	0.8	1.4	7.7	4.0	5.9	4.5	1.9
PPARGC1B	5.4	2.8	1.7	12.7	5.4	5.9	1.9	3.4	0.5	0.0	9.0	3.8	4.8	6.0	2.5
HDL-cholesterol	2.7	2.1	1.6	7.7	3.0	2.1	0.0	1.6	0.0	0.0	3.9	3.5	0.0	1.5	0.0

Des observations de dérégulation du métabolisme lipidique ont déjà été décrites. En effet, des études antérieures ont souligné une baisse de la concentration du cholestérol dans le plasma de bovins infectés par *T. congolense* (Biryomumaisho, 2003), de chèvres infectées par *T. brucei* et *T. congolense* (Biryomumaisho, 2003), de moutons infectés par *T. congolense* ((Katunguka-Rwakishaya et al., 1992), (Katunguka-Rwakishaya et al., 1997)) et de porcs infectés par *T. brucei* (Adamu et al., 2009). Cette diminution a également été observée dans des cas de trypanosomiase humaine africaine due à *T. b. gambiense* (Huet et al., 1990). De plus, il a été montré, chez des souris trypanotolérantes C57BL/6 infectées par *T. congolense*, une surrégulation des gènes impliqués dans la voie de synthèse du cholestérol (Kierstein et al., 2006). A l'inverse, chez des lapins infectés par *T. gambiense* (Diehl and Risby, 1974) et *T. b. brucei* (Rouzer and Cerami, 1980), des auteurs ont observé une augmentation de la concentration du cholestérol et des lipides (augmentation des lipoprotéines sériques VLDL et LDL mais diminution HDL) contenus dans le sérum. Mais le lapin n'est pas sensible à ces parasites.

De manière générale, les lipides ont des rôles multifonctionnels. Le cholestérol est un lipide de la famille des stérols jouant un rôle central dans de nombreux processus biochimiques. Il est le précurseur des hormones stéroïdiennes, de l'acide biliaire et de la vitamine D et est nécessaire au maintien de la fluidité de la membrane cellulaire, à la formation de la membrane, à la prolifération cellulaire et au développement embryonnaire (Rotllan and Fernandez-Hernando, 2012). Le cholestérol ainsi que les acides gras constituent donc des composants essentiels des membranes cellulaires chez les eucaryotes mais représentent également une source importante d'énergie emmagasinée dans de nombreux organismes. En tant que composés insolubles dans l'eau, ils ne peuvent pas être transportés par simple diffusion dans le plasma. Leur transport entre les organes est facilité par les lipoprotéines en circulation chez l'hôte et l'albumine.

Les deux principales classes de lipoprotéines sériques, les LDL (Low-density lipoprotein) et les HDL (high-density lipoprotein), sont des sources primaires de lipides, libérant des esters de cholestérol, du cholestérol et des phospholipides vers les trypanosomes (Green et al., 2003). Les niveaux de cholestérol sont maintenus grâce à un mécanisme complexe et bien régulé qui inclut la biosynthèse de novo, l'internalisation du cholestérol exogène et l'efflux d'excès de cholestérol.

En effet, les cellules de mammifères obtiennent le cholestérol soit par synthèse endogène directement dans la cellule et par transport par les lipoprotéines via le plasma à partir de sites de synthèse situés ailleurs dans l'organisme, soit par apport exogène à partir de l'alimentation (Ormerod and Venkatesan, 1982). La synthèse des acides gras et du cholestérol qui, à leur tour, donnent lieu à de multiples composés lipidiques, peut se produire dans n'importe quelle cellule

mais ces voies sont particulièrement importantes dans le foie et les tissus adipeux, organes spécialisés dans l'exportation ou le stockage des lipides (Eberle et al., 2004). La régulation du métabolisme du cholestérol par le produit final est obtenue principalement par la répression de la transcription des gènes qui régissent la synthèse du cholestérol et son absorption par les récepteurs à partir des lipoprotéines plasmatiques (Brown and Goldstein, 1997). Les facteurs de transcription classiques qui régulent l'homéostasie du cholestérol sont les protéines de liaison aux éléments régulateurs du stérol (SREBP) (Brown and Goldstein, 1997) et les récepteurs X du foie (LXR) (Peet et al., 1998).

Dans l'étiologie de la trypanosomose animale, le métabolisme des composants lipidiques de l'hôte est essentiel pour permettre au parasite de construire ses composants membranaires et de se développer (Nok, 2003). Chez *T. brucei*, les lipides constituent 11 à 18 % de son poids sec et leur distribution correspond à la gamme habituelle de lipides retrouvés chez les eucaryotes tels que les phospholipides, les lipides neutres, les acides gras, les isoprénoïdes et les stérols (Smith and Bütikofer, 2010). Néanmoins, contrairement aux cellules de mammifères, les formes sanguines de trypanosomes ne semblent montrer aucune activité pour la synthèse des acides gras et des stérols (Coppens et al., 1995). Ces parasites ont la particularité d'être auxotrophes aux stérols, c'est-à-dire qu'ils doivent acquérir ces derniers à partir du milieu dans lequel ils se trouvent puisqu'ils sont incapables de les synthétiser de novo (Green et al., 2003). Ils sont donc entièrement dépendants de leur hôte pour couvrir leurs besoins en source de carbone ((Opperdoes et al., 1976), (Authié et al., 1999)).

Les parasites sont également capables d'hydrolyser les lipides contenus dans les membranes des cellules de l'hôte afin d'acquérir ces molécules par endocytose ((Coppens et al., 1995), (Nok et al., 2003), (Bansal et al., 2005)) pour les métaboliser par la suite grâce à un répertoire d'enzymes (van Hellemond and Tielens, 2006). Il a été montré que la forme sanguine de *T. b. brucei* possède un récepteur piègeur de lipoprotéine (« scavenger receptor »), c'est-à-dire un récepteur capable de faciliter l'endocytose des lipoprotéines (Green et al., 2003).

La diminution de la concentration sérique en lipides et en cholestérol observée dans les études précédentes pourrait donc, en partie, résulter de l'utilisation des molécules, comme carburant énergétique, par les trypanosomes ((Traore, 1987), (Green, 2003), (Awekew, 2017)). L'hypothèse de cette consommation par les parasites pourrait ainsi expliquer d'une part l'état d'activation, inférée à partir de nos données, des voies et fonctions métaboliques liées à la production de cholestérol par l'hôte, afin de compenser son déficit en stérols et, d'autre part, l'état d'inhibition du cholestérol, en tant qu'upstream regulator ou molécule régulant sa synthèse en amont.

En tant que molécule indispensable au fonctionnement cellulaire et physiologique normal de l'organisme, une telle dérégulation du métabolisme du cholestérol pourrait ainsi induire des effets néfastes chez l'hôte (Wang et al., 2008) et compromettre l'intégrité des membranes plasmiques érythrocytaires et contribuer de ce fait à l'anémie (Traore-Leroux et al., 1987).

De plus, il apparaît que le métabolisme du cholestérol soit fortement impliqué dans la réponse immunitaire (Kay et al., 2006). En effet, il a été montré que la libération et la sécrétion du TNF α par les macrophages étaient dépendante du cholestérol (Kay et al., 2006). De plus, la voie d'activation LXR/RXR, enrichie dans notre jeu de données et particulièrement activée dans les contrastes BAO.40-0 et ZFU.40-0, est impliquée dans la régulation du métabolisme des lipides (lipogenèse, métabolisme du cholestérol, efflux de cholestérol) mais également dans l'immunité innée au niveau des macrophages (Joseph et al., 2004). Chez la race ZFU, de nombreux UpStream impliqués dans le métabolisme du cholestérol sont significativement activés et ce, de manière très précoce.

On trouve notamment SREBF1 et SREBF2 (Sterol regulatory element-binding transcription factor 1 / 2 ou SREBP) ainsi que SCAP (Sterol regulatory element-binding protein cleavage-activating protein connu également sous le nom de SREBP cleavage-activating protein) ou encore INSR.

Comme expliqué précédemment, l'homéostasie du cholestérol est obtenue grâce à un mécanisme de rétroaction qui surveille les taux de cholestérol et contrôle la transcription des gènes médiateurs de la biosynthèse et de l'absorption du cholestérol ((Goldstein et al., 2006), (Sun et al., 2007)). Ce système de régulation repose sur une famille de facteurs de transcription liés à la membrane, appelés protéines de liaison aux éléments régulateurs du stérol (SREBP) ainsi que sur les récepteurs X du foie (LXR). Les LXR sont activés en réponse à des taux de cholestérol élevés (oxystérols) et induisent l'expression de protéines impliquées dans l'absorption, le transport, l'excrétion et l'efflux de cholestérol (Rotllan and Fernandez-Hernando, 2012).

Les protéines SREBP sont impliquées dans le contrôle de l'expression d'une gamme d'enzymes nécessaires à l'absorption et à la synthèse du cholestérol, des triglycérides, des acides gras et des phospholipides endogènes (Eberle et al., 2004). Leur activation dépend d'une protéine membranaire appelée SCAP située dans le réticulum endoplasmique (RE). Dans les cellules dépourvues de cholestérol, cette protéine SCAP se lie aux protéines SREBP formant ainsi un complexe SCAP/SREBP et assure leur transport depuis le RE jusqu'à l'appareil de Golgi (Yang et al., 2002). Les SREBP sont ensuite clivées par protéolyse et stimulent la biosynthèse des stérols. A l'inverse, en présence de cholestérol, la protéine SCAP subit un

changement de conformation qui l'empêche d'activer le SREBP et de cette façon, la synthèse du cholestérol ne se produit pas (Brown and Goldstein, 1999).

INSR (insulin receptor ou récepteur à l'insuline) est un récepteur transmembranaire activé par l'insuline et appartenant à la grande classe des récepteurs à activité tyrosine kinase (Ward and Lawrence, 2009). L'insuline est impliquée dans de nombreux processus cellulaires, notamment la synthèse des protéines, la régulation de la biogenèse mitochondriale, la croissance ou encore le blocage de l'autophagie ((White, 2003), (Schultze et al., 2012)). La liaison de l'insuline à son récepteur déclenche une cascade d'événements cellulaires conduisant à l'absorption de nutriments et à l'activation de ces différents programmes cellulaires ((White, 2003), (Bunner et al., 2014)). Sur le plan métabolique, il a été montré chez la souris que le récepteur de l'insuline joue un rôle clé dans la régulation de l'homéostasie du glucose (Kitamura et al., 2003).

Outre la fonction métabolique, les récepteurs de l'insuline sont également exprimés sur les cellules immunitaires, telles que les macrophages, les cellules B et les cellules T. L'activation des cellules T est un processus exigeant en énergie, alimenté par une consommation accrue de glucose et accompagné d'une régulation positive du récepteur de l'insuline (INSR). Une étude a montré que le fait de taire l'INSR chez des rats altérait les fonctions sélectives des cellules T mais pas le développement des thymocytes (Fischer et al., 2017). De plus, les auteurs ont observé que le transport du glucose et la glycolyse dans les lymphocytes T CD4 + activés ont été compromis en l'absence de l'INSR, ce qui était associé à des altérations des voies de signalisation intracellulaires. Les défauts métaboliques observés ont coïncidé avec une production, une prolifération et une migration réduites de cytokines, ainsi qu'une apoptose accrue des cellules T CD4 +. Les auteurs suggèrent ainsi que la régulation positive de l'INSR sur les cellules T après l'activation est nécessaire pour une immunité adaptative efficace.

Des conclusions similaires ont été avancées (Tsai et al., 2018). Les auteurs ont montré que l'insuline et la signalisation en aval via son récepteur façonnent la fonction immunitaire adaptative en modulant le métabolisme des cellules T. Ils ont observé que les cellules T dépourvues d'expression des récepteurs de l'insuline présentaient une prolifération réduite spécifique de l'antigène et une production compromise de cytokines pro-inflammatoires. La signalisation du récepteur à l'insuline joue donc un rôle primordial dans les voies immuno-métaboliques et maximise ainsi l'effet des lymphocytes T au cours d'une infection aiguë et d'une inflammation.

Inversement, certains UpStream également impliqués dans le métabolisme du cholestérol sont significativement inhibés chez la race ZFU. On trouve parmi eux HDL-cholesterol, cholesterol, POR, INSIG1, INSIG2, CYP51A1, ACACB ou encore FDFT1.

Deux isoformes du gène induit par l'insuline (INSIG), désignées par INSIG1 et INSIG2, codent pour deux protéines étroitement apparentées du réticulum endoplasmique qui assurent la médiation du contrôle rétroactif du métabolisme des lipides ((Yang et al., 2002), (Yabe et al., 2002), (Liou et al., 2012)). Ces protéines sont en étroite interaction avec le complexe SCAP/SREBP décrits précédemment et jouent ensemble un rôle crucial dans la régulation, par rétroaction, de la synthèse du cholestérol ((Liu, 2009), (Yang et al., 2002)).

FDFT1 (Farnesyl-Diphosphate Farnesyltransferase 1 ou squalene synthase) et CYP51A1 (Cytochrome P450 Family 51 Subfamily A Member 1) sont deux gènes qui codent pour des enzymes essentielles la synthèse du cholestérol (Wang et al., 2008). L'enzyme codée par le gène POR (cytochrome p450 oxidoreductase) est nécessaire au fonctionnement normal de plus de 50 enzymes de la famille du cytochrome P450 notamment CYP51A1 (Režen et al., 2017). Enfin, ACACB (Acetyl-CoA Carboxylase Beta) code pour une enzyme appartenant à un système enzymatique multifonctionnel complexe. Cette enzyme joue un rôle clé dans la balance biosynthèse des acides gras/oxydation des acides gras (Abu-Elheiga et al., 2000).

Il apparait donc que chez la race ZFU, de nombreux UpStream sont impliqués dans le métabolisme du cholestérol que ce soit dans le sens d'une activation ou dans le sens d'une inhibition. Néanmoins, il existe de multiples boucles de régulation au sein de ces voies ce qui complexifie un peu plus l'interprétation des résultats.

La voie canonique de la gluconéogenèse était également fortement activée dans notre ensemble de données. La gluconéogenèse correspond à la formation de glucose à partir de précurseurs non glucidiques tels que le pyruvate, le lactate, le glycérol et la plupart des acides aminés. Elle se produit principalement dans le foie.

En outre, cette augmentation de la production de glucose par l'hôte pourrait être faite en réponse à la consommation excessive de glucose sanguin par les trypanosomes pour leur métabolisme par le biais de la voie de la glycolyse ((Anosa, 1988), (Takeet and Fagbemi, 2009), (Awekew A., 2017)). Une hypoglycémie a été observée, dans des études antérieures, chez des bovins Zébu infectés par *T. vivax* (Kadima et al., 2000) et les lapins infectés par *T. congolense* (Takeet and Fagbemi, 2009).

De plus, comme évoqué précédemment, il semble qu'une telle augmentation de la production soit également liée aux besoins énergétiques des cellules immunitaires.

Au sein de nos données, la glycolyse et surtout la phosphorylation oxydative ont été activées chez toutes les races. Des études ont montré que l'activation des macrophages dans l'immunité innée provoque un changement de métabolisme vers la glycolyse. En effet, le taux de glycolyse est augmenté de façon spectaculaire au cours de la phagocytose et de l'activité sécrétoire accrue des macrophages (Newsholme et al., 1986). C'est également le cas au sein des macrophages pro-inflammatoires (M1) ((Rodriguez-Prados et al., 2010), (Mills et al., 2017)) ou des cellules dendritiques (Krawczyk et al., 2010) activés par le LPS. La glycolyse est également renforcée dans les cellules NK (Natural Killer) activées (Donnelly et al., 2014) et dans les cellules T effectrices activées (Michalek et al., 2011).

Les sous-ensembles de cellules T montrent une augmentation de la glycolyse après activation, notamment les cellules T helper 17 (Th17) ((Shi et al., 2011), (McGettrick and O'Neill, 2013)), les cellules Th1 et Th2 (Michalek et al., 2011) et les cellules T effectrices CD8+ activées ((Gubser et al., 2013), (O'Neill et al., 2016)). Les cellules B activées semblent capables d'augmenter à la fois la glycolyse et la phosphorylation oxydative (Caro-Maldonado et al., 2014).

Toutes ces études et ainsi que de nombreuses autres ont indiqué que la glycolyse était cruciale pour le fonctionnement des cellules immunitaires. Néanmoins, d'un point de vue énergétique, la glycolyse ne constitue pas le moyen le plus efficace de générer de l'énergie via la production d'ATP (Adenosine triphosphate). En effet, la glycolyse génère 2 molécules d'ATP à partir d'une molécule de glucose, tandis que la phosphorylation oxydative est beaucoup plus efficace, générant 36 molécules d'ATP à partir d'une seule molécule de glucose. Cependant, la glycolyse peut être rapidement activée via l'induction d'enzymes impliquées dans cette voie alors que la phosphorylation oxydative nécessite une biogenèse mitochondriale, processus plus complexe et probablement plus lent.

Ainsi, les cellules immunitaires soumises à une activation rapide, par exemple en réponse à une stimulation des PRR (Pattern Recognition Receptor) qui sont des récepteurs cellulaires capables de reconnaître des motifs moléculaires caractéristiques des pathogènes, des récepteurs de cytokines ou encore des récepteurs d'antigènes passeront par une glycolyse accrue (O'Neill et al., 2016).

De plus, il a également été mis en évidence que la phosphorylation oxydative était plutôt associée aux macrophages ou lymphocytes Treg anti-inflammatoires (M2) ((Michalek et al., 2011), (McGettrick and O'Neill, 2013), (Mills et al., 2017)). Les sous-ensembles de lymphocytes

T, dotés de rôles immunologiques spécifiques, nécessitent donc des programmes métaboliques distincts pour soutenir leurs fonctions.

Au sein de nos données, les deux voies de production d'énergie ont été déduites comme étant activées ce qui confirme la présence de diverses populations de cellules immunitaires et / ou l'activation des cellules B.

Une étude a permis de démontrer qu'un métabolite excrété par *T. brucei* était capable d'interférer avec l'induction de la glycolyse chez les macrophages de souris et d'inhiber la sécrétion d'IL1B. Dans notre ensemble de données, le gène IL1B était significativement sous-régulé mais la glycolyse semblait néanmoins être activée.

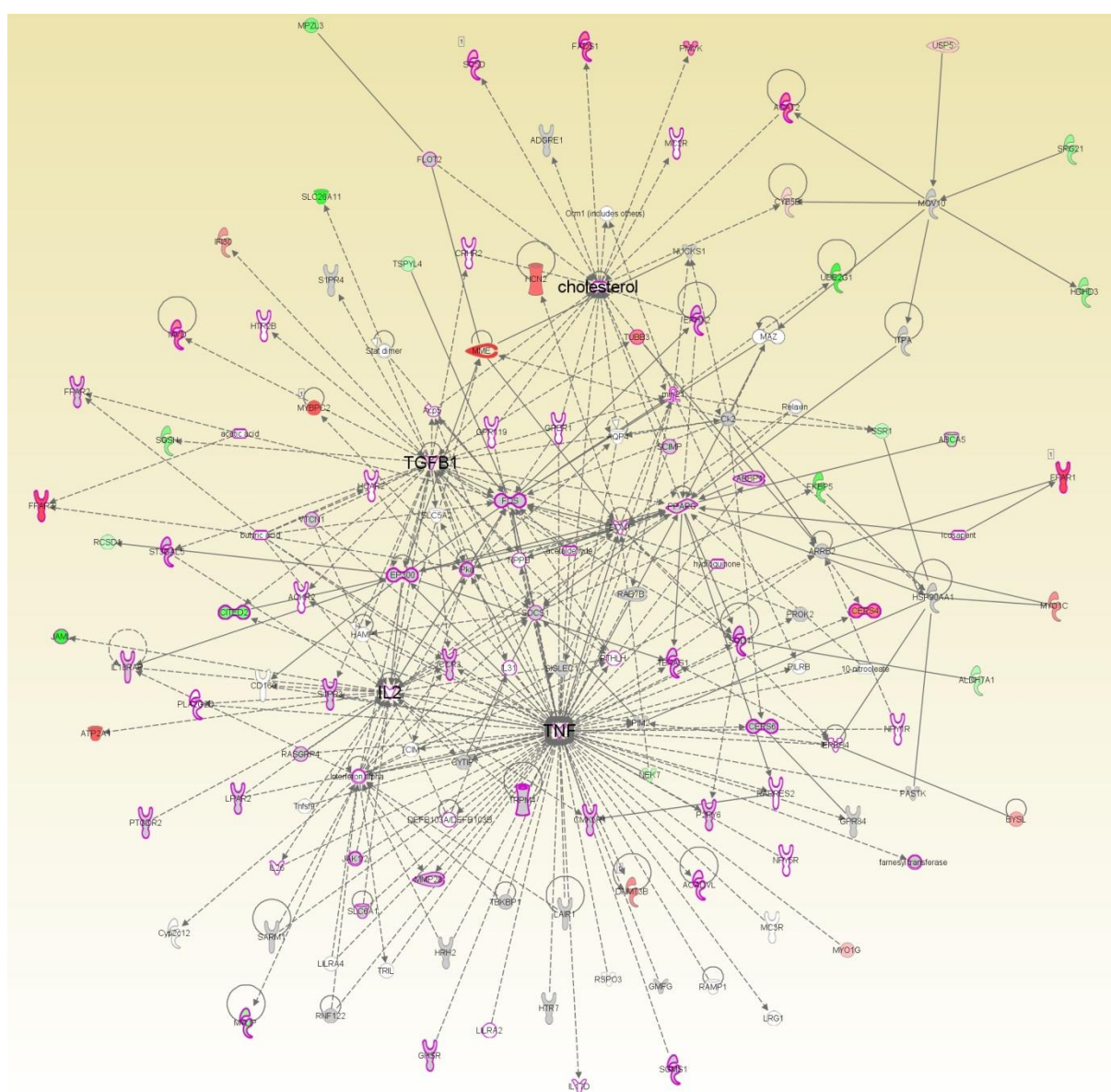


Figure 48 : Réseau du cholestérol au sein du contraste ZFU.20-0

Le réseau de la Figure 48, issu d'IPA représente les liens existants entre le cholestérol et des molécules du système immunitaire telles que le TNF, TGFB1 ou encore l'IL2. Les molécules surlignées en violet correspondent aux fonctions « réponse inflammatoire » et « métabolisme lipidique », les molécules colorées en vert et orange correspondent respectivement à des gènes sous-exprimés et surexprimés chez le Zébu au temps 20.

3.3.4 Différences subtiles entre les races

L'analyse globale de l'expression des gènes ainsi que des fonctions biologiques qui leurs sont associées a montré que, quelle que soit leur race (tolérante ou sensible), les bovins réagissaient de manière relativement similaire à l'infection, comme cela avait déjà été observé ((O'Gorman et al., 2006), (O'Gorman et al., 2009), (Noyes et al., 2011)). Néanmoins, certaines subtilités existent entre les différentes races notamment en termes d'intensité et de précocité de réponse à l'infection, d'enrichissement et d'intensité d'activation ou d'inhibition de certaines fonctions biologiques ou voies métaboliques.

Race N'Dama

Lors de l'infection, et comme nous le supposions, le transcriptome bovin a été modifié de façon très significative chez toutes les races. Toutefois, la race NDA a présenté, tout au long de l'infection, le plus grand nombre de gènes DE à l'exception de DPI.30 où la race LAG en a eu plus. La race NDA semblait ainsi réagir de façon plus précoce et plus intense à l'infection comme cela avait déjà été observé par (O'Gorman et al., 2009).

Parmi les fonctions associées au cycle cellulaire et au métabolisme de l'ADN ($p\text{-value} = 10^{-7}$, score $z\text{-score} = 3,7$), nous avons observé que la ségrégation des chromosomes ($p\text{-value} = 10^{-15}$ et un score $z\text{-score} = 2$), l'interphase, la mitose ainsi que la transition entre les phases G2 et M ont été fortement enrichies, de manière précoce à DPI.20 ainsi qu'à DPI.30.

Les CanPath enrichis chez cette race sont relatives à la voie de signalisation des sirtuines, au dérèglement des mitochondries et à la phosphorylation oxydative. On trouve également des voies enrichies associées au cycle cellulaire notamment l'entrée en phase S médiée par les œstrogènes, les voies des cyclines et la régulation du cycle cellulaire ($p\text{-value} = 10^{-6}$, $z\text{-score} = 2,4$) ou encore une voie associée à la réparation de l'ADN.

Parmi les UpStream significativement activés avec des valeurs de $z\text{-score}$ élevées, on trouve notamment CSF2 alors que RICTOR était significativement très inhibé.

La phosphorylation oxydative (B-H value = 10^{-12} , $z\text{-score} = 7,1$ à DPI.30-0) et le dysfonctionnement mitochondrial (B-H value = 10^{-12} , $z\text{-score} = \text{NA}$) ont été les CanPath les plus

enrichies chez la NDA. La glycolyse a également été enrichie chez NDA mais de façon moins marquée. La phosphorylation oxydative est un processus permettant la phosphorylation de l'ADP en ATP et a lieu au sein des mitochondries. Ces dernières sont connues pour jouer un rôle en tant qu'organites biosynthétiques et bioénergétiques (Weinberg et al., 2015). En effet, outre leur fonction dans le processus de libération d'énergie, les mitochondries sont également impliquées dans la biosynthèse de macromolécules et dans les signaux intracellulaires pro- ou anti- inflammatoires ((McGettrick and O'Neill, 2013), (Weinberg et al., 2015)).

Comme expliqué précédemment, il existe un lien étroit le métabolisme et l'activation des cellules immunitaires. En effet, la réponse immunitaire nécessite des modifications majeures des processus métaboliques, voire du métabolisme énergétique (Norata et al., 2015). La phosphorylation oxydative a été associée à un phénotype cellulaire de type anti-inflammatoire et à une réponse mémoire ((Michalek et al., 2011), (McGettrick and O'Neill, 2013) alors que la glycolyse est plutôt associée à une réponse pro-inflammatoire ou associée aux cellules B. Il a été montré que l'induction de la glycolyse était essentielle pour la production d'anticorps (Caro-Maldonado et al., 2014).

La voie de signalisation des sirtuines (B-H value = $5 * 10^{-7}$, z-score = 2,5 à DPI.20-0) fait également partie des Canpath extrêmement enrichis chez NDA dès DPI.20. Les sirtuines constituent une classe d'enzymes intervenant dans divers processus notamment l'inflammation, la restriction énergétique, la biogenèse des mitochondries ou encore la résistance au stress. Les sirtuines sont, non seulement, des capteurs énergétiques importants, mais elles protègent également les cellules contre les stress métaboliques (Chang and Guarente, 2014). Des auteurs ont suggéré son implication dans la réponse hypo-inflammatoire au cours d'une septicémie (Wang et al., 2018), alors que SIRT1 a été décrit pour inhiber les Tregs (Loftus and Finlay, 2016).

L'UpStream le plus activé chez NDA à DPI.20 était CSF2, connu également sous le nom GM-CSF (z-score = 6,97, p-value = 10^{-19}), cytokine importante sécrétée par de nombreuses cellules (macrophages, cellules T, cellules NK etc) et stimulant, lors d'une infection, la prolifération ainsi que la différenciation et l'activation des cellules myéloïdes (cellules dendritiques, macrophages, granulocytes ((Greter et al., 2012), (Becher et al., 2016)). Son rôle a été établi dans de nombreuses pathologies notamment dans des modèles d'inflammation et d'auto-immunité ou encore allergiques (Hamilton and Achuthan, 2013).

Lors de la phase chronique de la maladie, à partir de DPI.30, MYC est l'UpStream le plus activé. MYC (ou c-Myc) est un proto-oncogène, i.e. un gène impliqué dans le contrôle de la division cellulaire (stimulation) et dont la mutation est à l'origine de développement de tumeurs

chez la souris et l'homme (Pello et al., 2012). Il est fortement induit lors de l'activation des lymphocytes T (Wang et al., 2011) et il a été montré qu'il était également induit dans des macrophages humains activés de type M2. Il semble qu'il soit ainsi impliqué dans l'induction d'un grand nombre de gènes lors de l'activation alternative des macrophages (Pello et al., 2012). De plus, des auteurs ont mis en évidence son rôle dans la reprogrammation métabolique des lymphocytes T activés (Wang et al., 2011). Les propriétés métaboliques des lymphocytes T subissent d'importantes modifications au cours de leur transition entre les différents états de différenciation, du naïf à l'effecteur en passant par la mémoire ou leur rôle de régulateurs.

À l'inverse, RICTOR est l'UpStream le plus inhibé retrouvé chez NDA (z-score = -9,3 et p-value = 10^{-11} à DPI.40). Cette protéine est une sous unité du complexe mTORC2, impliqué dans la régulation de la croissance et la prolifération cellulaire (Shiota et al., 2006), la signalisation de l'insuline en favorisant la lipogenèse et la synthèse du glycogène (Yoon, 2017), ainsi que les fonctions des cellules immunitaires (développement des macrophages de type M2 (Hallowell et al., 2017), différenciation des cellules NK et Th2 (Wang et al., 2018).

Ces résultats montrent qu'une réponse proliférative importante et très précoce chez NDA a lieu, notamment au niveau des cellules myéloïdes et marquée par une activation forte de CSF2 et MYC. De plus, cela souligne encore le lien important qui existe entre la réponse immunitaire et le métabolisme énergétique.

Race Zébu

Chez la race ZFU, toutes les informations recueillies (DisFun, CanPath, UpStream) tendent à montrer que le métabolisme du cholestérol et des lipides était particulièrement enrichi. Les fonctions et les voies associées au métabolisme ont été significativement enrichies et activées, de manière très précoce, pour les contrastes ZFU (synthèse du cholestérol, BH value = 10^{-10} , z-score = 2,2 à ZFU.20-0, Biosynthèse du cholestérol, BH value = 10^{-22} , z-score = 3,7). À l'inverse, le cholestérol en tant qu'UpStream a été évalué comme étant fortement inhibé (p-value = 10^{-21} , z-score = -2,9 à DPI.20). Ces informations laissent penser qu'une consommation massive du cholestérol a eu lieu chez l'hôte et que les parasites en seraient les principaux protagonistes (cf. 3.3.3).

Deux CanPath associés l'immunité innée ont été significativement inhibés seulement chez ZFU. Il s'agit de la voie de signalisation TREM1 (B-H value = 10^{-5}) et la voie métabolique de l'inflammasome (B-H value = 10^{-4}) à DPI.40. TREM-1 est un important récepteur de signalisation exprimé sur les neutrophiles et les monocytes. Il joue un rôle important dans les infections systémiques. Il a été montré que le contact de TREM-1 à la surface de la membrane cellulaire entraîne l'activation d'une cascade d'événements intracellulaires qui aboutissent à des

effets inflammatoires, tels que la production de cytokines ou encore la dégranulation des neutrophiles et la phagocytose (Arts et al., 2012). De plus, la régulation à la hausse de TREM-1 semble être une étape cruciale lors de l'initiation de la réponse en cytokines écrasante lors du choc septique (Bouchon et al., 2001).

Race lagunaire

La comparaison des phénotypes trypanotolérants et trypanosensibles a montré que la race Lagunaire affichait un contrôle de la parasitémie supérieur à celui observé chez la race trypanotolérante de référence NDA. L'analyse en composante principale (ACP) sur l'expression normalisée des gènes montre que les transcriptomes des races NDA et LAG sont très proches et semblent évoluer de la même façon. De plus, à DPI.30, la race LAG est celle qui possède le plus de gènes DE comparé aux autres races.

L'analyse fonctionnelle a révélé que plusieurs fonctions et voies métaboliques étaient modifiées au cours de l'infection chez cette race. Un développement insuffisant (hypoplasie) des organes lymphoïdes et notamment du thymus a été activée pour LAG.30-0 (correspondant bien à une inhibition des fonctions des cellules T). Les fonctions du cycle cellulaire (transition de phase G2/M, interphase, ségrégation des chromosomes) ont été activées comme cela avait été observé chez NDA. De la même façon que chez NDA, le CanPath le plus activé était la phosphorylation oxydative (B-H value = 0,002, z-score = 5,6), le cycle de Krebs (B-H value = 0,005, z-score = 3,5) à DPI.30, un dysfonctionnement mitochondrial. (B-H value = 10^{-3}) ainsi que des fonctions associées au cycle cellulaire (régulation du point de contrôle des dommages de l'ADN G2/M (B-H value = 10^{-3}). Les UpStream les plus fortement activés étaient partagés avec les autres races. On trouve notamment CSF2 qui est fortement activé à DPI.20 (p-value= 10^{-6} , z-score=3.2) ainsi que MYC, HGF ou encore TCF3.

Race Baoulé

La race Baoulé est celle présentant le moins de gènes DE au cours de l'infection. L'ACP montre, sur l'axe 1, que les animaux BAO s'éloignent légèrement vers la droite, à DPI.0, en comparaison à leurs homologues trypanotolérants NDA et LAG. Le faible nombre de gènes DE trouvés chez cette race limite de fait les informations lors de l'analyse fonctionnelle. Toutefois, certaines fonctions ont été fortement enrichies à DPI.30 notamment le métabolisme du cholestérol et des lipides (Disfun : métabolisme du cholestérol (BH value = 10^{-7} , z-score = 2,6, Canpath : superpathway de la biosynthèse du cholestérol (BH value = 10^{-12} , z-score = 3,9) et UpStream : SREBF1 (p-value = 10^{-13} , z-score = 4,2). Ces fonctions ont également été retrouvées chez ZFU. A DPI.40, la quantité d'Ig (IgG et IgG2a) est significativement activée. Le cycle de

Krebs est également significativement activé comme c'était le cas pour LAG et NDA et de manière moins prononcée chez BOR.

On observe chez BAO, des réponses partagées par les autres races. Il semblerait qu'elle réponde de façon similaire à ZFU en ce qui concerne le métabolisme du cholestérol et des lipides et, par contre, présente des similitudes de réponses, en terme de métabolisme énergétique (cycle de Krebs) avec les races LAG et NDA.

Race Borgou

Cette race est une race métisse, croisement entre un bovin trypanotolérant et un bovin trypanosensible (Flori et al., 2014). Comme l'on pouvait s'y attendre, nous avons remarqué que, durant l'infection, la race Borgou présentait un phénotype intermédiaire en ce qui concerne les variables observées (PCV, parasitémie et taux de globules blancs) (Berthier et al., 2015). L'ACP montre, de la même manière, que les bovins métis ont des réponses intermédiaires et se placent, sur l'axe 2, entre les données issues des bovins de type taurin et les bovins de type Zébu. L'analyse fonctionnelle n'a pas mis en évidence de réponses spécifiques à cette race. Comme chez LAG, CSF2 est particulièrement activé à DPI.20 ($p\text{-value} = 10^{-20}$, $z\text{-score} = 5$ à DPI.20-0). Les CanPath liés au métabolisme du cholestérol sont également enrichis comme chez ZFU.

3.3.5 Limites

Les limites liées à l'expérimentation

Nous avons choisi d'infecter les animaux à l'aide d'une seringue et non par transmission naturelle via des glossines infectées. Cette stratégie a été motivée par le fait que nous souhaitons harmoniser et standardiser l'infection en termes de quantité de parasites injectés. Toutefois, ce choix nous a probablement privés du premier contact entre les parasites et le système immunitaire de l'hôte qui se produit au niveau du site d'inoculation lors d'infections en conditions naturelles, et dont on sait par ailleurs qu'il est important pour la mise en place d'une réponse immunitaire efficace. Nous pensions avoir suffisamment de différences significatives entre les races pour nous permettre de détecter des marqueurs moléculaires discriminants, ce qui n'a pas été le cas. Néanmoins il n'est pas certain non plus que les résultats d'une telle étude, dont l'infection aurait été menée via des mouches tsé-tsé, aient pu être comparables, tant il est vrai que les paramètres liés à la quantité de parasites injectés ou le taux d'infection des animaux auraient été aléatoires.

L'utilisation du compartiment sanguin nous a astreint à ne considérer que les transcriptomes des cellules circulantes, qu'elles soient celles de l'hôte ou le parasite lui-même. Ce choix a été dicté par la particularité de ce parasite dont la localisation est essentiellement sanguine,

notamment pour la souche que nous avons utilisée. L'objectif étant de fait de se focaliser sur les interactions cellulaires en lieu et place où le trypanosome se développe. Néanmoins, il est clair que les informations de sites particuliers comme le foie ou la rate, les ganglions lymphatiques ou le derme en cas d'infection naturelle, n'ont pas été considérés. Cependant, l'accès au foie ou la rate nécessite des procédures invasives, voire l'abattage des animaux, ce qui n'a jamais été envisagé.

Diverses mesures phénotypiques n'ont pas pu être exploitées au cours de cette étude. C'est le cas pour les données relatives au poids vif des bovins. En effet, ces données ont été collectées tout du long de l'expérimentation à l'aide d'un ruban barymétrique en l'absence de balance adaptée à la taille et au poids des animaux. Malheureusement, même si nous nous sommes assurés que ces données soient collectées par la même personne, pour éviter des variations dans la manière de procéder, ces données se sont révélées trop peu précises pour estimer une perte, un maintien ou une augmentation pondérale de nos animaux au cours de l'infection, car la méthode est très sensible à la position et aux mouvements des animaux. Ces données n'ont donc pas pu être exploitées.

Les données relatives à la numération formule sanguine (NFS) ont également été collectées. Toutefois, l'automate sur lequel nous allions faire nos formulations n'avait pas les paramètres appropriés pour le sang bovin (automate d'un laboratoire médical donc non modifiable). Nous avons donc réalisé une numération et une identification cellulaire manuelle à partir de frottis sanguins colorés, pour déterminer le pourcentage relatif des différentes populations cellulaires, avec toute l'incertitude que cela comporte, couplé à un comptage global du nombre de cellules nucléées et d'érythrocytes. Il est bien évident que l'utilisation d'un cytomètre en flux aurait permis d'obtenir des données cellulaires précises dont l'exploitation aurait permis de compléter l'interprétation des données transcriptomiques. De la même manière, ce type d'équipement nous aurait permis de rechercher si certains des éléments érythrocytaires possédaient encore un noyau, signe de la capacité de certains bovins à augmenter la production hématopoïétique en vue de faire face à une anémie massive.

Les limites des outils bioinformatiques et fonctionnels

Bien que le RNA-seq permette une analyse sans a priori, cette technique dépend toutefois de la qualité de l'assemblage de la séquence génomique et de son annotation au moment des analyses. On ne peut pas obtenir d'informations fonctionnelles si un gène est mal ou non annoté. Une nouvelle version de l'annotation est disponible depuis peu et contient entre autres les

récepteurs des cellules T $\delta\gamma$, spécifiques aux bovins. Cela n'était pas le cas sur la version utilisée pour l'analyse, et cette famille de gènes a été ignorée dans l'analyse.

En ce qui concerne l'analyse fonctionnelle via le logiciel IPA, nous dépendions des connaissances obtenues chez l'homme et les rongeurs de laboratoire. Ainsi, nous n'avions pas d'accès aux spécificités bovines puisque peu étudiées. En outre, la complexité des interactions et des boucles de rétroaction ne peut vraisemblablement pas être prise en compte dans un outil, qui est d'ailleurs évolutif et incrémenté tous les 6 mois par de nouvelles références bibliographiques. De plus, l'analyse transcriptomique a été réalisée sur l'ensemble de cellules sanguines nucléées dont certaines produisent les mêmes molécules (des interleukines par exemple). Il est dès lors assez difficile, voire impossible, d'attribuer avec précision la quantité de transcrits correspondant à tel ou tel type cellulaire et cela est d'autant plus vrai que la NFS dont nous disposions n'était pas précise eu égard à la méthode utilisée.

De plus, nous avons observé des associations mais cela ne nous donne aucune information sur la causalité. Par exemple, la forte modification du métabolisme lipidique observé chez le Zébu est-il la cause de sa susceptibilité ou bien une conséquence ?

Les limites biologiques

La variabilité individuelle du transcriptome est importante (les deux axes de l'ACP n'expliquent « que » 26 % de la variance), ce qui était attendu sur des animaux tout venant. Augmenter le nombre d'individus aurait peut-être permis d'augmenter le pouvoir statistique et de mettre en évidence quelques différences plus fines entre les races, mais la quantité de travail aurait été rédhibitoire en termes de ressources humaines et financières et ce pour un gain d'informations sans doute minime.

3.3.6 Perspectives

Cette étude nous a permis de mieux comprendre les mécanismes mis en place lors d'une infection trypanosomienne chez des races ayant des phénotypes de tolérance et sensibilité différents. Toutefois, les résultats ont montré que les mécanismes de régulations sont subtils. C'est pourquoi la perspective d'identifier des marqueurs moléculaires, tant biomarqueurs que marqueurs génétiques, permettant de distinguer le statut tolérant versus sensible semble assez illusoire.

Un des résultats majeurs obtenu au cours de ce travail repose sur un enrichissement important des voies biologiques associées au métabolisme et notamment à la biosynthèse des

stérols et du cholestérol. D'ailleurs, le statut nutritionnel des animaux est facteur important qui influe sur l'incidence d'une infection trypanosomienne et notamment la pathogénicité (Agyemang et al., 1990). Ainsi, l'amélioration des systèmes d'élevage avec par exemple un apport de fourrages locaux peut participer activement, à court terme et de façon durable, à la limitation de l'impact des trypanosomoses animales plus que ne le seraient des programmes d'amélioration génétique coûteux et compliqués à mettre en œuvre dans la mesure où il est difficile, voire impossible, de mesurer des phénotypes sur le terrain à la large échelle.

Une question se pose alors : Peut-on chercher à bloquer l'ingestion du cholestérol par les trypanosomes, grâce à de nouveaux composés pharmacologiques ?

Cette étude gagnerait également à être complétée par la mise en place de modèles cellulaires simples (mono ou multicellulaires) ayant pour but de se focaliser sur le dialogue moléculaire existant entre le parasite (et ses dérivés) et les cellules de l'hôte bovin. Bien qu'un tel type de modèle soit déconnecté des interactions globales présentes entre les différents types cellulaires *in vivo*, cette approche permettrait d'identifier les interactions d'un seul type cellulaire à la fois ce qui n'est pas possible dans une étude, telle que la nôtre, puisque les librairies RNAseq ont été réalisées à partir de l'ensemble des cellules nucléées du sang. Ainsi, l'utilisation d'approches de type Single-Cell (analyse à partir d'une seule cellule), permettrait d'obtenir des informations plus précises sur la réponse à l'infection d'un type cellulaire particulier. Couplé avec les données de notre présente étude, ce genre de données nous permettrait en outre de mieux comprendre le rôle de chaque type cellulaire en fonction du phénotype de l'hôte. Intéressante d'un point de vue fondamental, une telle étude aurait cependant peu de chance d'avoir de l'impact sur le terrain.

Au sein de notre étude, seul le transcriptome bovin a été analysé en termes de différentiel d'expression. L'analyse des données transcriptomiques du parasite doit maintenant être réalisée et devrait permettre d'identifier : i) les molécules les plus produites et qui de fait pourraient avoir un intérêt dans une démarche de développement de tests diagnostiques et / ou la mise au point d'outils thérapeutiques (traitement, vaccin), ii) d'identifier les mécanismes d'adaptation mis en place par le parasite pour échapper/moduler le système immunitaire de son hôte. Il serait intéressant d'identifier si les mécanismes mis en place par le parasite pour s'installer chez son hôte sont les mêmes, quel que soit le statut de tolérance/sensibilité de l'hôte ou si le parasite est capable de s'adapter à son environnement. Ainsi, cela permettrait de comprendre si la stratégie parasitaire est globale (identique quel que soit le statut de l'hôte) ou adaptative (en fonction du statut de l'hôte). Enfin, il sera intéressant de poursuivre l'exploration de nos données bovines,

dans le but de chercher des polymorphismes de séquences ou de variants d'épissage qui pourraient être associés à des différences entre les races, même si le dispositif de séquençage (50 nucléotides en lecture simple) est sans doute peu adapté à l'étude des variants d'épissage.

Cette recherche pourrait également être complétée par l'analyse des sérums bovins, récupérés lors de l'infection expérimentale, pour identifier les molécules immunogènes majeures du parasite au cours de la cinétique d'infection. Un inventaire exhaustif de ces molécules, ayant généré une réponse anticorps, serait un plus si l'on considère que les études antérieures ont été limitées eu égard à la technologie employée à l'époque et/ou le dispositif expérimental utilisé.

Conclusion

Cette étude est très novatrice. En effet, aucune étude similaire n'avait jamais été menée jusqu'à aujourd'hui sur un si grand nombre d'animaux, en conditions contrôlées et en utilisant des technologies de nouvelles générations. Même si j'ai mentionné des difficultés liées aux conditions d'expérimentation, je pense que nous avons réussi à relever le défi, sur le plan de l'organisation et de la logistique, posée par une telle étude menée au Burkina Faso. Et ceci grâce à un véritable travail d'équipe sur le terrain.

Le caractère trypanotolérant est, comme nous le savions, très complexe, multigénique et multifactoriel. Cette étude n'a pas permis d'identifier de marqueurs stricto sensu permettant de rendre compte de la tolérance ou de la sensibilité à l'infection et pouvant être utilisés comme marqueurs de sélection.

Néanmoins, nous avons pu accumuler des données pertinentes qui nous permettent de mieux appréhender les interactions hôte * pathogène et les différentes voies biologiques mises en jeu par les bovins.

Bibliographie

- Abraham, A., D. Semeles, A. Takele and D. Berhanu (2017). "Review on Characterization of *Trypanosoma congolense*; A Major Parasite of Cattle in Africa." Acta Parasitologica Globalis **8**(1): 39-49.
- Abrial, C. (2014). Caractérisation de la polarisation des macrophages pulmonaires humains et voies de régulation. Thèse de doctorat, Université de Versailles Saint Quentin en Yvelines: 126.
- Abu-Elheiga, L., W. R. Brinkley, L. Zhong, S. S. Chirala, G. Woldegiorgis and S. J. Wakil (2000). "The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2." Proceedings of the National Academy of Sciences **97**(4): 1444–1449.
- Adamu, S., N. Barde, J. N. Abenga, N. M. Useh, N. D. G. Ibrahim and K. A. N. Esievo (2009). "Experimental *Trypanosoma brucei* infection-induced changes in the serum profiles of lipids and cholesterol and the clinical implications in pigs " J. Cell Anim. Biol. **3**(2): 015-020.
- Aguirre, A., J. Blazquez-Prieto, L. Amado-Rodriguez, I. Lopez-Alonso, E. Batalla-Solis, A. Gonzalez-Lopez, M. Sanchez-Perez, C. Mayoral-Garcia, A. Gutierrez-Fernandez and G. M. Albaiceta (2017). "Matrix metalloproteinase-14 triggers an anti-inflammatory proteolytic cascade in endotoxemia." Journal of Molecular Medicine **95**: 487–497.
- Agyemang, K. (2000). "A review of status of trypanotolerant livestock in West and Central Africa". Report: International Livestock Research Institute: 105.
- Ahmed, M. S., S. E. Byeon, Y. Jeong, M. A. Miah, M. Salahuddin, Y. Lee, S. S. Park and Y. S. Bae (2015). "Dab2, a negative regulator of DC immunogenicity, is an attractive molecular target for DC-based immunotherapy." OncoImmunology **4**(1): e984550.
- Akol, G. W. O., E. Authie, M. Pinder, S. K. Moloo, G. E. Roelants and M. Murray (1986). "Susceptibility and immune responses of Zebu and taurine cattle of West Africa to infection with *Trypanosoma congolense* transmitted by *Glossina morsitans centralis*." Veterinary Immunology and Immunopathology **11**(4): 361-373.
- Alexander, D. H., J. Novembre and K. Lange (2009). "Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals." Genome Research **19**: 1655-1664
- Allan, A. J., N. D. Sanderson, S. Gubbins, S. A. Ellis and J. A. Hammond (2015). "Cattle NK Cell Heterogeneity and the Influence of MHC Class I." The Journal of immunology **195**(5): 2199-2206.
- Allchin, F. R. (1969). Early domestic animals in India and Pakistan. The Domestication and Exploitation of Plants and Animals. P. J. Ucko and G. W. Dimbleby: 317-322.
- Alsan, M. (2015). "The Effect of the TseTse Fly on African Development." American Economic Review **105**(1): 382-410.
- Alvarez, I., L. Perez-Pardal, A. Traore, I. Fernandez and F. Goyache (2016). "African Cattle do not Carry Unique Mutations on the Exon 9 of the ARHGAP15 Gene." Anim Biotechnol **27**(1): 9-12.
- Alvarez, I., L. Perez-Pardal, A. Traore, I. Fernandez and F. Goyache (2016). "Lack of haplotype structuring for two candidate genes for trypanotolerance in cattle." J Anim Breed Genet **133**(2): 105-114.
- Alvarez, I., L. Perez-Pardal, A. Traore, I. Fernandez and F. Goyache (2016). "Lack of specific alleles for the bovine chemokine (C-X-C) receptor type 4 (CXCR4) gene in West African cattle questions its role as a candidate for trypanotolerance." Infect Genet Evol **42**: 30-33.

- Anosa, V. O. (1988). "Haematological and biochemical changes in human and animal trypanosomiasis. Part I." Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop **41**(2): 151-164.
- Arango Duque, G. and A. Descoteaux (2014). "Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases." Frontiers in immunology **5**: 491-491.
- Arredouani, M., Z. Yang, Y. Ning, G. Qin, R. Soininen, K. Tryggvason and L. Kobzik (2004). "The scavenger receptor MARCO is required for lung defense against pneumococcal pneumonia and inhaled particles." The Journal of Experimental Medicine **200**: 267-272.
- Arts, R. J., L. A. B. Joosten, J. W. M. van der Meer and M. G. Netea (2012). "TREM-1: intracellular signaling pathways and interaction with pattern recognition receptors." Journal of Leukocyte Biology **93**: 209-215.
- Arunachalam, B., U. T. Phan, H. J. Geuze and P. Cresswell (2000). "Enzymatic reduction of disulfide bonds in lysosomes: Characterization of a Gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase (GILT)." Proceedings of the National Academy of Sciences **97**(2): 745-750.
- Assoku, R. K. G. and P. R. Gardiner (1989). "Detection of antibodies to platelets and erythrocytes during haemorrhagic Trypanosoma vivax infection of Ayrshire cattle." Veterinary Parasitology **31**: 199-216.
- Authié, E. (1993). Contribution à l'étude des mécanismes immunologiques impliqués dans la trypanotolérance des taurins d'Afrique. Thèse de doctorat : Sciences de la Vie. Biologie-Santé Thèse, Université de Bordeaux II : 300.
- Authié, É., F. Bringaud, N. Bakalara, E. Tetaud and T. Baltz (1999). "Trypanosomoses humaines et animales: maladie du sommeil et Nagana." Annales de l'Institut Pasteur / Actualités **10**(1): 27-50.
- Authié, E., G. Duvallet, C. Robertson and D. J. L. Williams (1993). "Antibody-Responses to a 33 Kda Cysteine Protease of Trypanosoma-Congolense - Relationship to Trypanotolerance in Cattle." Parasite Immunology **15**(8): 465-474.
- Authié, E., D. K. Muteti and D. J. L. Williams (1993). "Antibody responses to invariant antigens of Trypanosoma congolense in cattle of differing susceptibility to trypanosomiasis." Parasite Immunology **15**: 101-111.
- Authié, E. and T. Pobel (1990). "Serum haemolytic complement activity and C3 levels in bovine trypanosomosis under natural conditions of challenge — Early indications of individual susceptibility to disease." Veterinary Parasitology **35**(1): 43-59.
- Awekew A. (2017). "Review on Serum Biochemical Changes in Ruminants Infected with Major Trypanosome Species." International Journal of Advanced Research in Biological Sciences (IJARBS) **4**(10): 26-35.
- Badran, B. M., K. Kunstman, J. Stanton, M. Moschitta, A. Zerghe, H. Akl, A. Burny, S. M. Wolinsky and K. Willard-Gallo (2005). "Transcriptional Regulation of the Human CD3 Gene: The TATA-Less CD3 Promoter Functions via an Initiator and Contiguous Sp-Binding Elements." The Journal of Immunology **174**: 6238-6249.
- Baetselier, P. D., B. Namangala, W. Noel, L. Brys, E. Pays and A. Beschin (2001). "Alternative versus classical macrophage activation during experimental African trypanosomosis." Int J Parasitol **31**(5-6): 575-587.
- Bansal, D., H. S. Bhatti and R. Sehgal (2005). "Role of cholesterol in parasitic infections." Lipids Health Dis **4**: 10.
- Becher, B., S. Tugues and M. Greter (2016). "GM-CSF: From Growth Factor to Central Mediator of Tissue Inflammation." Immunity **45**(5): 963-973.

- Bellier, S. and N. Cordonnier (2010). "Les valeurs usuelles en hématologie vétérinaire." Revue Francophone des Laboratoires **2010**(420): 27-42.
- Benard, E. L., S. J. Roobol, H. P. Spaink and A. H. Meijer (2014). "Phagocytosis of mycobacteria by zebrafish macrophages is dependent on the scavenger receptor Marco, a key control factor of pro-inflammatory signalling." Developmental & Comparative Immunology **47**(2): 223-233.
- Bengaly, Z. (2003). Pathogénicité comparée de trois types phylogénétiques distincts de l'espèce *Trypanosoma congolense*. Thèse de doctorat: UFR Sciences de la vie et de la terre ; Sciences biologiques appliquées ; Biologie et physiologie animales Université de Ouagadougou: 130.
- Bengaly, Z., S. H. Vitouley, M. B. Somda, A. Zongo, A. Têko-Agbo, G. Cecchi, Y. Adam, I. Sidibé, B. Bayala, A. M. G. Belem, J. Van Den Abbeele and V. Delespaulx (2018). "Drug quality analysis of isometamidium chloride hydrochloride and diminazene diaceturate used for the treatment of African animal trypanosomosis in West Africa." BMC Veterinary Research **14**(1): 361.
- Benjamini, Y. and Y. Hochberg (1995). "Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing." Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological) **57**(1): 289-300.
- Bernard, Q., B. Jaulhac and N. Boulanger (2014). "Smuggling across the Border: How Arthropod-Borne Pathogens Evade and Exploit the Host Defense System of the Skin." Journal of Investigative Dermatology **134**(5): 1211-1219.
- Berthier, D. (2009). Contribution à l'identification des gènes associés à la trypanotolérance bovine par une approche transcriptomique SAGE. Thèse de doctorat: Parasitologie, Université Montpellier II, Sciences et techniques du Languedoc : 185.
- Berthier, D., I. Chantal, S. Thevenon, J. Marti, D. Piquemal and J. C. Maillard (2006). "Bovine transcriptome analysis by SAGE technology during an experimental *Trypanosoma congolense* infection." Ann N Y Acad Sci **1081**: 286-299.
- Berthier, D., I. Chantal, S. Thevenon, H. Sakande, J. C. Maillard, Z. Bengaly, D. Piquemal, J. Marti and G. Cuny (2008). "Study of bovine trypanotolerance by whole transcriptome analysis." Ann N Y Acad Sci **1149**: 71-76.
- Berthier, D., M. Peyllhard, G. K. Dayo, L. Flori, S. Sylla, S. Bolly, H. Sakande, I. Chantal and S. Thevenon (2015). "A comparison of phenotypic traits related to trypanotolerance in five west african cattle breeds highlights the value of shorthorn taurine breeds." PLoS One **10**(5): e0126498.
- Biryomumaisho (2003). "serum biochemical changes in experimental *trypanosoma congolense* and *trypanosoma brucei* infection in small east african goats " Veterinarski Arhiv **73**(3): 167-180.
- Bischoff, L., S. Alvarez, D. L. Dai, G. Soukhatcheva, P. C. Orban and C. B. Verchere (2015). "Cellular mechanisms of CCL22-mediated attenuation of autoimmune diabetes." The Journal of Immunology **194**: 3054-3064.
- Black, S. J., M. Muranjan and Q. Wang (1997). "Identification of the cape buffalo serum trypanocidal protein: xanthine: oxygen oxidoreductase." Biochemical Society Transactions **25**(3): 534S.
- Black, S. J., E. Sicard, N. Murphy and D. Nolan (2001). "Innate and acquired control of trypanosome parasitaemia in Cape buffalo." International Journal for Parasitology **31**: 562-565.

- Bocquentin, R. and G. Duvallet (1990). "Amélioration de la reproductibilité du test ELISA adapté à la détection d'anticorps anti-*Trypanosoma congolense* chez les bovins." Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux **43**(2): 179-186.
- Boda, C., B. Courtioux, P. Roques, L. Pervieux, G. Vatunga, T. Josenando, C. R. Ayenengoye, B. Bouteille, M.-O. Jauberteau and S. Bisser (2009). "Immunophenotypic Lymphocyte Profiles in Human African Trypanosomiasis." PLOS ONE **4**(7): e6184.
- Bonomi, A., F. Bassetti, P. Gabrieli, J. Beadell, M. Falchetto, F. Scolari, L. M. Gomulski, E. Regazzini, J. O. Ouma, A. Caccone, L. M. Okedi, G. M. Attardo, C. R. Guglielmino, S. Aksoy and A. R. Malacrida (2011). "Polyandry Is a Common Event in Wild Populations of the Tsetse Fly *Glossina fuscipes fuscipes* and May Impact Population Reduction Measures." PLOS Neglected Tropical Diseases **5**(6): e1190.
- Borst, P. and G. Rudenko (1994). "Antigenic variation in African trypanosomes." Science **264**(5167): 1872-1873.
- Bosschaerts, T., M. Guilliams, B. Stijlemans, Y. Morias, D. Engel, F. Tacke, M. Hérin, P. De Baetselier and A. Beschin (2010). "Tip-DC Development during Parasitic Infection Is Regulated by IL-10 and Requires CCL2/CCR2, IFN- γ and MyD88 Signaling." PLoS Pathogens **6**(8): e1001045.
- Bouchon, A., F. Facchetti, M. A. Weigand and M. Colonna (2001). "TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock." Nature **410**(6832): 1103-1107.
- Boulangé, A. (1995). Clonage et expression des gènes codant pour une HSP70/BIP et une cysteine protease de *Trypanosoma congolense*. Utilisation de ces antigènes dans l'étude de la trypanotolérance bovine. Thèse d'université : Sciences Biologiques et Médicales, Biologie-Santé Thèse, Université de Bordeaux II: 150.
- Boulangé, A., D. Pillay, C. Chevtzoff, N. Biteau, V. Come de Graca, L. Rempeters, D. Theodoridis and T. Baltz (2017). "Development of a rapid antibody test for point-of-care diagnosis of animal African trypanosomosis." Vet Parasitol **233**: 32-38.
- Bouyer, F., S. Hamadou, H. Adakal, R. Lancelot, F. Stachurski, A. M. G. Belem and J. Bouyer (2011). "Restricted Application of Insecticides: A Promising Tsetse Control Technique, but What Do the Farmers Think of It?" PLOS Neglected Tropical Diseases **5**(8): e1276.
- Bouyer, F., M. T. Seck, A. H. Dicko, B. Sall, M. Lo, M. J. B. Vreysen, E. Chia, J. Bouyer and A. Wane (2014). "Ex-ante Benefit-Cost Analysis of the Elimination of a *Glossina palpalis gambiensis* Population in the Niayes of Senegal." PLOS Neglected Tropical Diseases **8**(8): e3112.
- Bouyer, J., F. Bouyer, M. Donadeu, T. Rowan and G. Napier (2013). "Community- and farmer-based management of animal African trypanosomosis in cattle." Trends Parasitol **29**(11): 519-522.
- Bouyer, J., A. H. Dicko, G. Cecchi, S. Ravel, L. Guerrini, P. Solano, M. J. Vreysen, T. De Meeus and R. Lancelot (2015). "Mapping landscape friction to locate isolated tsetse populations that are candidates for elimination." Proc Natl Acad Sci U S A **112**(47): 14575-14580.
- Bouyer, J., L. Guerrini, M. Desquesnes, S. de la Rocque and D. Cuisance (2006). "Mapping African Animal Trypanosomosis risk from the sky." Veterinary Research **37**(633-645).
- Bowdish, D. M. E. and S. Gordon (2009). "Conserved domains of the class A scavenger receptors: evolution and function." Immunological Reviews **227**(1): 19-31.
- Bowdish, D. M. E., K. Sakamoto, M.-J. Kim, M. Kroos, S. Mukhopadhyay, C. A. Leifer, K. Tryggvason, S. Gordon and D. G. Russell (2009). "MARCO, TLR2, and CD14 Are Required

- for Macrophage Cytokine Responses to Mycobacterial Trehalose Dimycolate and Mycobacterium tuberculosis." PLOS Pathogens **5**(6): e1000474.
- Bradley, D. G., D. E. MacHugh, P. Cunningham and R. T. Loftus (1996). "Mitochondrial diversity and the origins of African and European cattle." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **93**(10): 5131-5135.
- Brown, M. S. and J. L. Goldstein (1997). "The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor." Cell **89**: 331-340.
- Brown, M. S. and J. L. Goldstein (1999). "A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **96**(20): 11041-11048.
- Budd, L. T. (1999). DFID-funded Tsetse and Trypanosome Research and Development Since 1980: Economic analysis, DFID **2**: 123.
- Bunner, A. E., P. C. Chandrasekera and N. D. Barnard (2014). "Knockout mouse models of insulin signaling: Relevance past and future." World journal of diabetes **5**(2): 146-159.
- Cantu, C., V. Grande, I. Alborelli, L. Cassinelli, I. Cantu, M. T. Colzani, R. Ierardi, L. Ronzoni, M. D. Cappellini, G. Ferrari, S. Ottolenghi and A. Ronchi (2011). "A highly conserved SOX6 double binding site mediates SOX6 gene downregulation in erythroid cells." Nucleic acids research **39**(2): 486-501.
- Caro-Maldonado, A., R. Wang, A. G. Nichols, M. Kuraoka, S. Milasta, L. D. Sun, A. L. Gavin, E. D. Abel, G. Kelsoe, D. R. Green and J. C. Rathmell (2014). "Metabolic reprogramming is required for antibody production that is suppressed in anergic but exaggerated in chronically BAFF-exposed B cells." The Journal of Immunology **192**: 3626-3636.
- Carr, M. W., S. Roth, E. Luther, S. S. Rose and T. A. Springer (1994). "Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant." Proc Natl Acad Sci USA **91**: 3652-3656.
- Casella, G., L. Garzetti, A. T. Gatta, A. Finardi, C. Maiorino, F. Ruffini, G. Martino, L. Muzio and R. Furlan (2016). "IL4 induces IL6-producing M2 macrophages associated to inhibition of neuroinflammation in vitro and in vivo." Journal of neuroinflammation **13**(1): 139-139.
- Cecchi, G., M. Rc., J. Slingenbergh and S. de la Rocque (2008). "Land cover and tsetse fly distributions in sub-Saharan Africa." Medical and Veterinary Entomology **22**: 364-373.
- Chabannon, C. and P. Mannoni (1995). "Les cellules souches hématopoïétiques du sang périphérique chez l'homme." Med Sci (Paris) **11**(1): 17-27.
- Chacko, E. and S. Ranganathan (2009). "Genome-wide analysis of alternative splicing in cow: implications in bovine as a model for human diseases." BMC Genomics **10** (Suppl 3): S11.
- Challier, A. and C. Laveissière (1973). "Un nouveau piège pour la capture des glossines (Glossina : Diptera, Muscidae) : description et essais sur le terrain." Cahiers ORSTOM.Série Entomologie Médicale et Parasitologie **11**(4): 251-262.
- Chang, C. I., J. Liao and L. Kuo (1998). "Arginase modulates nitric oxide production in activated macrophages." Am J Physiol **274**(1): H342-348.
- Chang, H.-C. and L. Guarente (2014). "SIRT1 and other sirtuins in Metabolism." Trends in endocrinology and metabolism: TEM **25**(3): 138-145.
- Chao, L. C., Z. Zhang, L. Pei, T. Saito, P. Tontonoz and P. F. Pilch (2007). "Nur77 coordinately regulates expression of genes linked to glucose metabolism in skeletal muscle." Molecular Endocrinology **21**(9): 2152-2163.

- Chen, C., S. S. Khaleel, H. Huang and C. H. Wu (2014). "Software for pre-processing Illumina next-generation sequencing short read sequences." Source Code for Biology and Medicine **9**: 8.
- Chessel, D., A. Dufour and J. Thioulouse (2004). "The ade4 package - I : One-table methods." R News **4**: 5-10.
- Connelley, T. K., C. Longhi, A. Burrells, K. Degnan, J. Hope, A. J. Allan, J. A. Hammond, A. k. Storset and W. I. Morrison (2014). "NKp46+ CD3+ cells: a novel nonconventional T cell subset in cattle exhibiting both NK cell and T cell features." The Journal of Immunology **192**(8): 3868–3880.
- Coppens, I., T. Levade and P. J. Courtoy (1995). "Host plasma low density lipoprotein particles as an essential source of lipids for the bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*." The Journal of Biological Chemistry **270**(11): 5736-5741.
- Correia, C. N., K. E. McLoughlin, N. C. Nalpas, D. A. Magee, J. A. Browne, K. Rue-Albrecht, S. V. Gordon and D. E. MacHugh (2018). "RNA sequencing (RNA-seq) reveals extremely low levels of reticulocyte-derived globin gene transcripts in peripheral blood from horses (*Equus caballus*) and cattle (*Bos taurus*)." Frontiers in Genetics **2**: 278.
- Courtin, D., D. Berthier, S. Thevenon, G. K. Dayo, A. Garcia and B. Bucheton (2008). "Host genetics in African trypanosomiasis." Infect Genet Evol **8**(3): 229-238.
- Coustou, V., F. Guegan, N. Plazolles and T. Baltz (2010). "Complete in vitro life cycle of *Trypanosoma congolense*: development of genetic tools." PLoS Negl Trop Dis **4**(3): e618.
- Coustou, V., N. Plazolles, F. Guegan and T. Baltz (2012). "Sialidases play a key role in infection and anaemia in *Trypanosoma congolense* animal trypanosomiasis." Cell Microbiol **14**(3): 431-445.
- Cuisance, D., J. Irtard, M. Desquesnes, S. de la Rocque and J. Frézil (2003). Trypanosomoses Epidémiologie. Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail. EMI. **2**: 1627-1650.
- Cuisance, D. and J. Itard (1973). "Behavior of sterile males of *Glossina tachinoides* West. released in their natural habitat; Fort Lamy (Chad) area. I. Transport, release, biological rhythm, effect on the wild life population." Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux **26**(1): 55-76.
- Cuisance, D., J. Itard, P. Solano, M. Desquesnes, J. Frézil and E. Authie (2003). Trypanosomoses Méthodes de lutte. Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail. EMI. **2**: 1695-1724.
- Cuisance, D., H. Politzar, M. Clair, E. Sellin and Y. Tazé (1978). "Impact des lâchers de mâles stériles sur les niveaux de deux populations sauvages de *Glossina palpalis gambiensis* en Haute-Volta (sources de la Volta Noire)." Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux **31**(3): 315-328.
- D'Ieteren, G. D., E. Authié, N. Wissocq and M. Murray (1998). "Trypanotolerance, an option for sustainable livestock production in areas at risk from trypanosomosis." Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. **17**(1): 154-175.
- Dargie, J. D., P. K. Murray, M. Murray, W. R. T. Grimshaw and W. I. M. McIntyre (1979). "Bovine trypanosomiasis: the red cell kinetics of Ndama and Zebu cattle infected with *Trypanosoma congolense*." Parasitology **78**(3): 271-286.
- Davis, W. C., k. W. Brown, M. J. Hamilton, C. R. Wyatt, J. A. Orden, A. M. Khalid and J. Naessens (1996). "Analysis of monoclonal antibodies specific for the gamma delta TcR." Veterinary Immunology and Immunopathology **52**(4): 275-283.

- Dayo, G. K., Z. Bengaly, S. Messad, B. Bucheton, I. Sidibe, B. Cene, G. Cuny and S. Thevenon (2010). "Prevalence and incidence of bovine trypanosomosis in an agro-pastoral area of southwestern Burkina Faso." Res Vet Sci **88**(3): 470-477.
- Dayo, G. K., M. Gautier, D. Berthier, J. P. Poivey, I. Sidibe, Z. Bengaly, A. Eggen, D. Boichard and S. Thevenon (2012). "Association studies in QTL regions linked to bovine trypanotolerance in a West African crossbred population." Anim Genet **43**(2): 123-132.
- Dayo, G. K., S. Thevenon, D. Berthier, K. Moazami-Goudarzi, C. Denis, G. Cuny, A. Eggen and M. Gautier (2009). "Detection of selection signatures within candidate regions underlying trypanotolerance in outbred cattle populations." Mol Ecol **18**(8): 1801-1813.
- De Baetselier, P. (1996). Mechanisms underlying trypanosome-induced T-cell immunosuppression. T-cell subsets and cytokines interplay in infectious diseases. A. S. Mustafa, R. J. Al-Attiyah, I. Nath and T. D. Chugh, Karger Publishers: 124-139.
- De Muylder, G., S. Daulouede, L. Lecordier, P. Uzureau, Y. Morias, J. Van Den Abbeele, G. Caljon, M. Herin, P. Holzmuller, S. Semballa, P. Courtois, L. Vanhamme, B. Stijlemans, P. De Baetselier, M. P. Barrett, J. L. Barlow, A. N. McKenzie, L. Barron, T. A. Wynn, A. Beschin, P. Vincendeau and E. Pays (2013). "A Trypanosoma brucei kinesin heavy chain promotes parasite growth by triggering host arginase activity." PLoS Pathog **9**(10): e1003731.
- Delespaulx, V., H. Dinka, J. Masumu, P. Van den Bossche and S. Geerts (2008). "Five-fold increase in Trypanosoma congolense isolates resistant to diminazene aceturate over a seven-year period in eastern Zambia." Drug Resist Updat. **11**(6): 205-209.
- Descamps, B. (2002). Immunité et immunité comparée des bovins trypanosensibles et trypanotolérants vis-à-vis des trypanosomes pathogènes. Manuscrit diplôme d'études supérieures spécialisées productions animales en régions chaudes. CIRAd-EMVT; Université de Montpellier II: 30.
- Deshmane, S. L., S. Kremlev, S. Amini and B. E. Sawaya (2009). "Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview." Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research **29**(6): 313-326.
- Desquesnes, M. (1997). "Evaluation of a simple PCR technique for the diagnosis of Trypanosoma vivax infection in the serum of cattle in comparison to parasitological techniques and antigen-enzyme-linked immuno sorbent assay." Acta Trop **65**(3): 139-148.
- Desquesnes, M. (2017). Recueil des Protocoles de Diagnostic du Laboratoire de Référence de l'OIE sur les Trypanosomoses animales d'origine Africaine. CIRAD: 103.
- Desquesnes, M. and M. L. Dia (2003). "Mechanical transmission of Trypanosoma congolense in cattle by the African tabanid Atylotus agrestis." Exp Parasitol. **105**(3-4): 226-231.
- Desquesnes, M. and M. L. Dia (2004). "Mechanical transmission of Trypanosoma vivax in cattle by the African tabanid Atylotus fuscipes." Veterinary Parasitology **119**(1): 9-19.
- Desquesnes, M., J. Itard, G. Cuny, P. Solano and E. Authie (2003). Trypanosomoses Diagnostic. Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail. EMI. **2**: 1679-1694.
- Diehl, E. J. and E. L. Risby (1974). "Serum changes in rabbits experimentally infected with Trypanosoma gambiense." Am J Trop Med Hyg. **23**(6): 1019-1022.
- Dobin, A., C. A. Davis, F. Schlesinger, J. Drenkow, C. Zaleski, S. Jha, P. Batut, M. Chaisson and T. R. Gingeras (2013). "STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner." Bioinformatics **29**(1): 15-21.

- Dombrowicz, D., S. Lin, V. Flamand, A. T. Brini, B. H. Koller and J.-P. Kinet (1998). "Allergy-Associated FcR β Is a Molecular Amplifier of IgE- and IgG-Mediated In Vivo Responses." Immunity **8**(4): 517-529.
- Donnelly, R. P., R. M. Loftus, S. E. Keating, K. T. Liou, C. A. Biron, C. M. Gardiner and D. K. Finlay (2014). "mTORC1-dependent metabolic reprogramming is a prerequisite for NK cell effector function." The Journal of Immunology **193**: 4477-4484.
- Dorfman, D. M., D. Wilson, G. A. Bruns and S. H. Orkin (1992). "Human transcription factor GATA-2. Evidence for regulation of preproendothelin-1 gene expression in endothelial cells." The Journal of Biological Chemistry **267**(2): 1279-1285.
- Duleu, S., P. Vincendeau, P. Courtois, S. Semballa, I. Lagroye, S. Daulouede, J. L. Boucher, K. T. Wilson, B. Veyret and A. P. Gobert (2004). "Mouse Strain Susceptibility to Trypanosome Infection: An Arginase-Dependent Effect." The Journal of Immunology **172**(10): 6298-6303.
- Dwinger, R. F., M. Murray and S. K. Moloo (1987). "Potential value of localized skin reactions (chancres) induced by Trypanosoma congolense transmitted by Glossina morsitans centralis for the analysis of metacyclic trypanosome populations." Parasite Immunology **9**: 353-362.
- Eberle, D., H. B., P. Bossard, P. Ferre and F. Foufelle (2004). "SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis." Biochimie **86**(11): 839-848.
- Edwards, C. J., J. F. Baird and D. E. MacHugh (2007). "Taurine and zebu admixture in Near Eastern cattle: a comparison of mitochondrial, autosomal and Y-chromosomal data." Anim Genet **38**(5): 520-524.
- Edwards, C. J., R. Bollongino, A. Scheu, A. Chamberlain, A. Tresset, J.-D. Vigne, J. F. Baird, G. Larson, S. Y. W. Ho, T. H. Heupink, B. Shapiro, A. R. Freeman, M. G. Thomas, R.-M. Arbogast, B. Arndt, L. Bartosiewicz, N. Benecke, M. Budja, L. Chaix, A. M. Choyke, E. Coqueugniot, H.-J. Döhle, H. Göldner, S. Hartz, D. Helmer, B. Herzig, H. Hongo, M. Mashkour, M. Özdoğan, E. Pucher, G. Roth, S. Schade-Lindig, U. Schmölcke, R. J. Schulting, E. Stephan, H.-P. Uerpmann, I. Vörös, B. Voytek, D. G. Bradley and J. Burger (2007). "Mitochondrial DNA analysis shows a Near Eastern Neolithic origin for domestic cattle and no indication of domestication of European aurochs." Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences **274**(1616): 1377-1385.
- Elhussein, M., E. Altayeb, M. S. Mohamed and F. B. Abdalla (2016). "Local elevation of CCL22: A new trend in immunotherapy (skin model)." Journal of Cellular Immunotherapy **2**(2): 79-84.
- Elsen, P., A. Ma. and M. Leclercq (1990). "First record of Glossina fuscipes fuscipes Newstead, 1910 and Glossina morsitans submorsitans Newstead, 1910 in southwestern Saudi Arabia." Ann Soc Belg Med Trop **70**(4): 281-287.
- Epstein, H. (1971). The origin of the domestic animals of Africa. Africana Publishing Corporation; New York, USA **1**: 575.
- Esievo, K., D. Saror, M. Kolo and L. Eduvie (1986). "Erythrocyte surface sialic acid in Ndama and Zebu cattle." Journal of Comparative Pathology **96**(1): 95-99.
- Facer, C. A., J. M. Crosskey, M. J. Clarkson and G. C. Jenkins (1982). "Immune haemolytic anaemia in bovine trypanosomiasis." Journal of Comparative Pathology **92**(3): 393-401.
- Fairlamb, A. H. and A. Cerami (1992). "Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida." Annu Rev Microbiol **46**: 695-729.
- Firth, S. M. and R. C. Baxter (2002). "Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins." Endocrine Reviews **23**(6): 824-854.

- Fischer, H. J., C. Sie, E. Schumann, A. K. Witte, R. Dressel, J. van den Brandt and H. M. Reichardt (2017). "The Insulin Receptor Plays a Critical Role in T Cell Function and Adaptive Immunity." *the Journal of Immunology* **198**: 1910-1920.
- Flori, L., S. Thevenon, G. K. Dayo, M. Senou, S. Sylla, D. Berthier, K. Moazami-Goudarzi and M. Gautier (2014). "Adaptive admixture in the West African bovine hybrid zone: insight from the Borgou population." *Mol Ecol* **23**(13): 3241-3257.
- Flynn, J. N. and M. Sileghem (1991). "The role of the macrophage in induction of immunosuppression in *Trypanosoma congolense*-infected cattle." *Immunology* **74**(2): 310-316.
- Franco, J. R., P. P. Simarro, A. Diarra, J. A. Ruiz-Postigo and J. G. Jannin (2014). "The journey towards elimination of gambiense human African trypanosomiasis: not far, nor easy." *Parasitology* **141**: 748-760.
- Franke, A., T. Balschun, C. Sina, D. Ellinghaus, R. Hasler, G. Mayr, M. Albrecht, M. Wittig, E. Buchert, S. Nikolaus, C. Gieger, H. E. Wichmann, J. Sventoraityte, L. Kupcinskis, C. M. Onnie, M. Gazouli, N. P. Anagnou, D. Strachan, W. L. McArdle, C. G. Mathew, P. Rutgeerts, S. Vermeire, M. H. Vatn, P. Rosenstiel, T. H. Karlsen and S. Schreiber (2010). "Genome-wide association study for ulcerative colitis identifies risk loci at 7q22 and 22q13 (IL17REL)." *Nat Genet* **42**(4): 292-294.
- Freeman, A. R., C. Hoggart, O. Hanotte and D. G. Bradley (2006). "Assessing the relative ages of admixture in the bovine hybrid zones of Africa and the Near East using X chromosome haplotype mosaicism." *Genetics* **173**: 1503-1510.
- Freeman, A. R., C. M. Meghen, D. E. MacHugh, R. T. Loftus, M. D. Achukwi, A. Bado, B. Sauveroche and D. G. Bradley (2004). "Admixture and diversity in West African cattle populations." *Mol Ecol* **13**(11): 3477-3487.
- Freshney, N. W., L. Rawlinson, F. Guesdon, E. Jones, S. Cowley, J. Hsuan and J. Saklatvala (1994). "Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27." *Cell* **78**: 1039-1049.
- Gansler, J., K. T. Preissner and S. Fischer (2013). "Influence of proinflammatory stimuli on the expression of vascular ribonuclease 1 in endothelial cells." *FASEB Journal* **28**(2): 752-760.
- Gautier, M., L. Flori, A. Riebler, F. Jaffrézic, D. Laloé, I. Gut, K. Moazami-Goudarzi and J.-L. Foulley (2009). "A whole genome Bayesian scan for adaptive genetic divergence in West African cattle." *BMC Genomics* **10**(1): 550.
- Geerts, S., P. H. Holmes, M. C. Eisler and O. Diall (2001). "African bovine trypanosomiasis: the problem of drug resistance." *Trends Parasitol.* **17**(1): 25-28.
- Geerts, S., S. Osaer, B. Goossens and D. Faye (2009). "Trypanotolerance in small ruminants of sub-Saharan Africa." *Trends Parasitol* **25**(3): 132-138.
- Geiger, A., C. Hirtz, T. Becue, E. Bellard, D. Centeno, D. Gargani, M. Rossignol, G. Cuny and J.-B. Peltier (2010). "Exocytosis and protein secretion in *Trypanosoma*." *BMC Microbiology* **10**: 20.
- Geigy, R. and M. Kauffmann (1971). "Sleeping sickness survey in the Serengeti area (Tanzania) 1971. I. Examination of large mammals for trypanosomes." *Acta Trop* **30**(1): 12-23.
- Geigy, R., M. Kauffmann and L. Jenni (1973). "Wild mammals as reservoirs for Rhodesian sleeping sickness in the Serengeti, 1970-71." *Trans R Soc Trop Med Hyg* **67**(2): 284-286.
- Geurts, N., G. Opdenakker and P. E. Van den Steen (2011). "Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in protozoan parasitic infections." *Pharmacology & Therapeutics* **133**(3): 257-279.

- Ghadially, H., X.-L. Ross, C. Kerst, J. Dong, A. B. Reske-Kunz and R. Ross (2005). "Differential Regulation of CCL22 Gene Expression in Murine Dendritic Cells and B Cells." The Journal of Immunology **174**(9): 5620.
- Gibson, W., L. Peacock, V. Ferris, K. Williams and M. Bailey (2008). "The use of yellow fluorescent hybrids to indicate mating in *Trypanosoma brucei*." Parasit Vectors **1**(1): 4.
- Giordani, F., L. J. Morrison, T. G. Rowan, H. P. De Koning and M. P. Barrett (2016). "The animal trypanosomiasis and their chemotherapy: a review." Parasitology **143**(14): 1862-1889.
- Gobert, A. P., S. Daulouede, M. Lepoivre, J. L. Boucher, B. Bouteille, A. Buguet, R. Cespuglio, B. Veyret and P. Vincendeau (2000). "L-Arginine availability modulates local nitric oxide production and parasite killing in experimental trypanosomiasis." Infect Immun **68**(8): 4653-4657.
- Goldstein, J., Y. K. Ho, S. K. Basu and M. S. Brown (1979). "Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition." Proc Natl Acad Sci USA **76**(1): 333-337.
- Goldstein, J. L., R. A. DeBose-Boyd and M. S. Brown (2006). "Protein Sensors for Membrane Sterols." Cell **124**(1): 35-46.
- Gough, P. J. and S. Gordon (2000). "The role of scavenger receptors in the innate immune system." Microbes Infect **2**(3): 305-311.
- Green, C. H. (1986). "Effects of colours and synthetic odours on the attraction of *Glossina pallidipes* and *G. morsitans morsitans* to traps and screens." Physiological Entomology **11**: 411-421.
- Green, C. H. (1988). "The effect of colour on trap- and screen-orientated responses in *Glossina palpalis palpalis* (Robineau-Desvoidy) (Diptera: Glossinidae)." Bulletin of Entomological Research **78**(4): 591-604.
- Green, H. P., M. Del Pilar Molina Portela, E. N. St Jean, E. B. Lugli and J. Raper (2003). "Evidence for a *Trypanosoma brucei* lipoprotein scavenger receptor." J Biol Chem **278**(1): 422-427.
- Greter, M., J. Helft, A. Chow, D. Hashimoto, A. Mortha, J. Agudo-Cantero, M. Bogunovic, E. L. Gautier, J. Miller and M. Leboeuf (2012). "GM-CSF controls nonlymphoid tissue dendritic cell homeostasis but is dispensable for the differentiation of inflammatory dendritic cells." Immunity **36**(6): 1031-1046.
- Grigson, C. (1978). "The craniology and relationships of four species of *Bos*. 4. The relationship between *Bos primegenius* Boj. and *B. taurus* L. and its implication for the phylogeny of the domestic breeds." Journal of Archaeological Science **5**: 123-152.
- Gubser, P. M., G. Bantug, L. Razik, M. Fischer, S. Dimeloe, G. Hoenger, B. Durovic, A. Jauch and C. Hess (2013). "Rapid effector function of memory CD8⁺ T cells requires an immediate-early glycolytic switch." Nat Immunol. **14**(10): 1064-1072.
- Guegan, F., N. Plazolles, T. Baltz and V. Coustou (2013). "Erythrophagocytosis of desialylated red blood cells is responsible for anaemia during *Trypanosoma vivax* infection." Cellular Microbiology **15**(8): 1285-1303.
- Hallowell, R. W., S. L. Collins, J. M. Craig, Y. Zhang, M. Oh, P. B. Illei, Y. Chan-Li, C. L. Vigeland, W. Mitzner, A. L. Scott, J. D. Powell and M. R. Horton (2017). "mTORC2 signalling regulates M2 macrophage differentiation in response to helminth infection and adaptive thermogenesis." Nature Communications **8**: 14208.

- Hamilton, J. A. and A. Achuthan (2013). "Colony stimulating factors and myeloid cell biology in health and disease." Trends in Immunology **34**(2): 81-89.
- Hanna, R. N., L. M. Carlin, H. G. Hubbeling, D. Nackiewicz, A. M. Green, J. A. Punt, F. Geissmann and C. C. Hedrick (2011). "The transcription factor NR4A1 (Nur77) controls bone marrow differentiation and the survival of Ly6C- monocytes." Nature immunology **12**(8): 778-785.
- Hanna, R. N., I. Shaked, H. G. Hubbeling, J. A. Punt, R. Wu, E. Herrley, C. Zaugg, H. Pei, F. Geissmann, K. Ley and C. C. Hedrick (2012). "NR4A1 (Nur77) deletion polarizes macrophages toward an inflammatory phenotype and increases atherosclerosis." Circ Res **110**(3): 416-427.
- Hanotte, O., D. Bradley, J. W. Ochieng, Y. Verjee, E. W. Hill and J. E. Rege (2002). "African pastoralism: genetic imprints of origins and migrations." Science **296**(5566): 336-339.
- Hanotte, O., Y. Ronin, M. Agaba, P. Nilsson, A. Gelhaus, R. Horstmann, Y. Sugimoto, S. Kemp, J. Gibson, A. Korol, M. Soller and A. Teale (2003). "Mapping of quantitative trait loci controlling trypanotolerance in a cross of tolerant West African N'Dama and susceptible East African Boran cattle." Proc Natl Acad Sci USA **100**(13): 7443-7448.
- Hanotte, O., C. I. Tawah, D. G. Bradley, M. Okomo, Y. Verjee, J. Ochieng and J. E. Rege (2000). "Geographic distribution and frequency of a taurine *Bos taurus* and an indicine *Bos indicus* Y specific allele amongst sub-saharan African cattle breeds." Mol Ecol **9**(4): 387-396.
- Harden, J. L., S. M. Lewis, S. R. Lish, M. Suarez-Farinas, D. Gareau, T. Lentini, L. M. Johnson-Huang, J. G. Krueger and M. A. Lowes (2015). "The tryptophan metabolism enzyme L-kynureninase is a novel inflammatory factor in psoriasis and other inflammatory diseases." Journal of Allergy and Clinical Immunology **137**(6): 1830-1840.
- Harris, T. H., N. M. Cooney, J. M. Mansfield and D. M. Paulnock (2006). "Signal transduction, gene transcription, and cytokine production triggered in macrophages by exposure to trypanosome DNA." Infection and immunity **74**(8): 4530-4537.
- Hauer, N. N., H. Sticht, S. Boppudi, C. Büttner, C. Kraus, U. Trautmann, M. Zenker, C. Zweier, A. Wiesener, R. A. Jamra, D. Wiczorek, J. Kelkel, A.-M. Jung, S. Uebe, A. B. Ekici, T. Rohrer, A. Reis, H.-G. Dörr and C. T. Thiel (2017). "Genetic screening confirms heterozygous mutations in ACAN as a major cause of idiopathic short stature." Scientific Reports **7**(1): 12225.
- Hill, E. W., G. M. O'Gorman, M. Agaba, J. P. Gibson, O. Hanotte, S. J. Kemp, J. Naessens, P. M. Coussens and D. E. MacHugh (2005). "Understanding bovine trypanosomiasis and trypanotolerance: the promise of functional genomics." Vet Immunol Immunopathol **105**(3-4): 247-258.
- Hoare, C. A. (1966). "The classification of mammalian trypanosomes." Ergeb Mikrobiol Immunitätsforsch Exp Ther **39**: 43-57.
- Holzmüller, P., P. Grebaut, J. B. Peltier, J. P. Brizard, T. Perrone, M. Gonzatti, Z. Bengaly, M. Rossignol, P. M. Aso, P. Vincendeau, G. Cuny, A. Boulange and R. Frutos (2008). "Secretome of animal trypanosomes." Ann N Y Acad Sci **1149**: 337-342.
- Horn, D. (2014). "Antigenic variation in African trypanosomes." Molecular and Biochemical Parasitology **195**(2): 123-129.
- Hoste, C., E. Chalon, G. D'Ieteren and J. C. M. Trail (1988). Le bétail trypanotolérant en Afrique occidentale et centrale. Vol. 3. Bilan d'une décennie. Etude FAO : Production et Santé Animales; Rome, Italie, FAO: 281.

- Huet, G., J. L. Lemesre, G. Grard, F. Noireau, F. Boutignon, M. C. Dieu, J. Jannin and P. Degand (1990). "Serum lipid and lipoprotein abnormalities in human African trypanosomiasis." Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene **84**(6): 792-794.
- Hung, W. S., P. Ling, J. C. Cheng, S. S. Chang and C. P. Tseng (2016). "Disabled-2 is a negative immune regulator of lipopolysaccharide-stimulated Toll-like receptor 4 internalization and signaling." Sci Rep **6**: 35343.
- Hurst, S. M., T. Wilkinson, R. M. McLoughlin, S. Jones, S. Horiuchi, N. Yamamoto, S. Rose-John, G. M. Fuller, N. Topley and S. A. Jones (2001). "Il-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation." Immunity **14**: 705–714.
- Igbokwe, I. O., I. A. Umar, I. Obara, S. Di, A. A. Ilemobade, K. Esievo and D. I. Saror (1995). "Erythrocyte glutathione concentrations in Nigerian Zebu and Ndama cattle." Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux **48**(2): 177-179.
- Ilboudo, H., R. Bras-Gonçalves, M. Camara, L. Flori, O. Camara, H. Sakande, M. Leno, E. Petitdidier, V. Jamonneau and B. Bucheton (2014). "Unravelling human trypanotolerance: IL8 is associated with infection control whereas IL10 and TNF α are associated with subsequent disease development." PLoS pathogens **10**(11): e1004469-e1004469.
- Illumina (2016). An introduction to Next-Generation Sequencing Technology. Report Illumina: 16.
- Ipseiz, N., S. Uderhardt, C. Scholtysek, M. Steffen, G. Schabbauer, A. Bozec, G. Schett and G. Kronke (2014). "The nuclear receptor Nr4a1 mediates anti-inflammatory effects of apoptotic cells." the Journal of Immunology **192**: 4852-4858.
- Itard, J. (1986). Les glossines ou mouches tsé-tsé. Etudes et synthèses de l'IEMVT; Maisons-Alfort, France, CIRAD-IEMVT: 155.
- Itard, J. and J. Frézil (2003). Trypanosomoses symptômes et lésions. Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail. EMI. **2**: 1657-1667.
- Jablonski, K. A., S. A. Amici, L. M. Webb, D. Ruiz-Rosado Jde, P. G. Popovich, S. Partida-Sanchez and M. Guerau-de-Arellano (2015). "Novel Markers to Delineate Murine M1 and M2 Macrophages." PLoS One **10**(12): e0145342.
- Jackson, A. P., A. Berry, M. Aslett, H. C. Allison, P. Burton and J. Vavrova-Anderson (2012). "Antigenic diversity is generated by distinct evolutionary mechanisms in African trypanosome species." Proc Natl Acad Sci USA. **109**(9): 3416–3421.
- Jackson, A. P., S. Goyard, D. Xia, B. J. Foth, M. Sanders, J. M. Wastling, P. Minoprio and M. Berriman (2015). "Global Gene Expression Profiling through the Complete Life Cycle of *Trypanosoma vivax*." PLoS Negl Trop Dis **9**(8): e0003975.
- Jamonneau, V., P. Solano, M. Koffi, M. Denizot and G. Cuny (2004). "Contributions and limits of the diagnosis of human African trypanosomiasis." Médecine/sciences **20**: 871-875.
- Joseph, S. B., M. N. Bradley, A. Castrillo, K. W. Bruhn, P. A. Mak, L. Pei, J. Hogenesch, R. M. O'Connell, G. Cheng, E. Saez, J. F. Miller and P. Tontono (2004). "LXR-Dependent Gene Expression Is Important for Macrophage Survival and the Innate Immune Response." Cell **119**(2): 299-309.
- Kabelitz, D., C. Peters, D. Wesch and H.-H. Oberg (2013). "Regulatory functions of $\gamma\delta$ T cells." International Immunopharmacology **16**(3): 382-387.

- Kadima, K. B., E. O. Gyang, D. I. Saror and K. A. Esievo (2000). "Serum biochemical values of *Trypanosoma vivax*-infected cattle and the effects of lactose in saline infusion." Veterinarski Arhiv **70**(2): 67-74.
- Kaetzel, C. S. (2014). "Coevolution of Mucosal Immunoglobulins and the Polymeric Immunoglobulin Receptor: Evidence That the Commensal Microbiota Provided the Driving Force." ISRN Immunology **2014**: 20.
- Kanda, H., S. Tateya, Y. Tamori, K. Kotani, K.-i. Hiasa, R. Kitazawa, S. Kitazawa, H. Miyachi, S. Maeda, K. Egashira and M. Kasuga (2006). "MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity." The Journal of Clinical Investigation **116**(6): 1494-1505.
- Katende, J., A. J. Musoke, V. M. Nantulya and B. M. Goddeeris (1987). "A new method for fixation and preservation of trypanosomal antigens for use in the indirect immunofluorescence antibody test for diagnosis of bovine trypanosomiasis." Tropical medicine and parasitology **38**(1): 41-44.
- Katunguka-Rwakishaya, E., M. Murray and P. H. Holmes (1992). "The pathophysiology of ovine trypanosomosis: haematological and blood biochemical changes." Veterinary Parasitology **45**(1): 17-32.
- Katunguka-Rwakishaya, E., M. Murray and P. H. Holmes (1997). "Pathophysiology of *Trypanosoma congolense* infection in two breeds of sheep, Scottish Blackface and Finn Dorset." Veterinary Parasitology **68**(3): 215-225.
- Kay, J. G., R. Murray, J. K. Pagan and J. L. Stow (2006). "Cytokine secretion via cholesterol-rich lipid raft-associated SNAREs at the phagocytic cup." The Journal of Biological Chemistry **281**(17): 11949-11954.
- Kierstein, S., H. Noyes, J. Naessens, Y. Nakamura, C. Pritchard, J. Gibson, S. Kemp and A. Brass (2006). "Gene expression profiling in a mouse model for African trypanosomiasis." Genes Immun **7**(8): 667-679.
- Kim, S. J., S. Ka, J. W. Ha, J. Kim, D. Yoo, K. Kim, H. K. Lee, D. Lim, S. Cho, O. Hanotte, O. A. Mwai, T. Dessie, S. Kemp, S. J. Oh and H. Kim (2017). "Cattle genome-wide analysis reveals genetic signatures in trypanotolerant N'Dama." BMC Genomics **18**(1): 371.
- Kitamura, T., C. Kahn and D. Accili (2003). "Insulin receptor knockout mice." Annu Rev Physiol **65**: 313-332.
- Kobayashi, A. and I. R. Tizard (1976). "The response to *Trypanosoma congolense* infection in calves. Determination of immunoglobulins IgG1, IgG2, IgM and C3 levels and the complement fixing antibody titres during the course of infection." Tropenmed. Parasit. **27**: 411-417.
- Kolev, N. G., J. B. Franklin, S. Carmi, H. Shi, S. Michaeli and C. Tschudi (2010). "The transcriptome of the human pathogen *Trypanosoma brucei* at single-nucleotide resolution." PLoS Pathog **6**(9): e1001090.
- Kone, N., F. Bouyer, H. S. Vitouley and I. Sidibe (2012). "Perceptions des éleveurs et stratégies de gestion du risque trypanosomiens dans le bassin du fleuve Mouhoun (Burkina Faso)." Cah Agric **21**: 404-416.
- Kos, J., A. Sekirnik, A. Premzl, V. Zavasnik Bergant, T. Langerholc, B. Turk, B. Werle, R. Golouh, U. Repnik, M. Jeras and V. Turk (2005). "Carboxypeptidases cathepsins X and B display distinct protein profile in human cells and tissues." Experimental Cell Research **306**: 103-113.

- Kos, J., T. Vizin, U. P. Fonovic and A. Pislari (2015). "Intracellular signaling by cathepsin X: molecular mechanisms and diagnostic and therapeutic opportunities in cancer." Seminars in Cancer Biology **31**: 76-83.
- Kraal, G., L. van der Laan, O. Elomaa and K. Tryggvason (2000). "The macrophage receptor MARCO." Microbes Infect **2**(3): 313-316.
- Kramer, A., J. Green, J. Pollard, Jr. and S. Tugendreich (2014). "Causal analysis approaches in Ingenuity Pathway Analysis." Bioinformatics **30**(4): 523-530.
- Krawczyk, C. M., T. Holowka, J. Sun, J. Blagih, E. Amiel, R. J. DeBerardinis, J. R. Cross, E. Jung, C. B. Thompson, R. G. Jones and E. J. Pearce (2010). "Toll-like receptor-induced changes in glycolytic metabolism regulate dendritic cell activation." Blood **115**(23): 4742-4749.
- Krishnan, S., V. Warke, M. P. Nambiar, H. K. Wong, G. C. Tsokos and D. L. Farber (2001). "Generation and biochemical analysis of human effector CD4 T cells: alterations in tyrosine phosphorylation and loss of CD3zeta expression." Blood **97**(12): 3851-3859.
- Kristjanson, P., B. Swallow, G. J. Rowlands, R. L. Kruska and P. N. de Leeuw (1999). "Measuring the costs of African animal trypanosomiasis, the potential benefits of control and returns to research." Agricultural Systems **59**: 79-98.
- Kropf, P., J. Fuentes, E. Fahnrich, F. E., L. Arpa, S. Herath, V. Weber, G. Soler, A. Celada, M. Modolell and I. Muller (2005). "Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo." FASEB Journal **19**(8): 1000-1002.
- Labie, D. (2012). "Red blood cells erythrophagocytosis." Hématologie **18**(2): 138-139.
- Lalmanach, G., A. Boulange, C. Serveau, F. Lecaille, J. Scharfstein and F. Gauthier (2002). "Congopain from *Trypanosoma congolense*: drug target and vaccine candidate." Biol Chem **383**: 739-749.
- Langley, P. A., J. W. Hargrove and R. L. Wall (1990). "Maturation of the tsetse fly *Glossina pallidipes* (Diptera: Glossinidae) in relation to trap-orientated behaviour." Physiological Entomology **15**(2): 179-186.
- Laroche, L. (2018). Evaluation au laboratoire des effets du pyriproxyphène sur *Glossina palpalis gambiensis* en vue de son utilisation dans le cadre de l'approche "Boosted SIT". Mémoire; Diplôme de Master International en Entomologie Médicale et Vétérinaire: 51.
- Laveissière, C., D. Couret and J.-P. Kiénu (1981). "Lutte contre les glossines riveraines à l'aide de pièges biconiques imprégnés d'insecticide, en zone de savane humide : 4. Expérimentation à grande échelle." Cahiers ORSTOM.Série Entomologie Médicale et Parasitologie **19**(1): 41-48.
- Laveissière, C. and P. Grébaud (1990). "Recherches sur les pièges à glossines (Diptera : Glossinidae) : mise au point d'un modèle économique : le piège "Vavoua". Trop Med Parasitol **41**: 185-192.
- Le Cao, K. A., F. Rohart, I. Gonzales, S. Dejean, B. Gautier, F. Bartolo, P. Monget, J. Coquery, F. Yao and B. Lique (2016). "mixOmics: Omics Data Integration Project." from R package version 6.1.1." <https://CRAN.R-project.org/package=mixOmics>.
- Lejon, V., J. Lardon, G. Kenis, L. Pinoges, D. Legros, S. Bisser, X. N'Siesi, E. Bosmans and P. Buscher (2002). "Interleukin (IL)-6, IL-8 and IL-10 in serum and CSF of *Trypanosoma brucei* gambiense sleeping sickness patients before and after treatment." Trans R Soc Trop Med Hyg **96**(3): 329-333.
- Lejon, V., D. Mumba Ngoyi, L. Kestens, L. Boel, B. Barbé, V. Kande Betu, J. van Griensven, E. Bottieau, J.-J. Muyembe Tamfum, J. Jacobs and P. Büscher (2014). "Gambiense Human

- African Trypanosomiasis and Immunological Memory: Effect on Phenotypic Lymphocyte Profiles and Humoral Immunity." *PLOS Pathogens* **10**(3): e1003947.
- Li, H., B. Handsaker, A. Wysoker, T. Fennell, J. Ruan, N. Homer, G. Marth, G. Abecasis, R. Durbin and S. Genome Project Data Processing (2009). "The Sequence Alignment/Map format and SAMtools." *Bioinformatics* **25**(16): 2078-2079.
- Li, Q. X., N. Ke, R. Sundaram and F. Wong-Staal (2006). "NR4A1, 2, 3--an orphan nuclear hormone receptor family involved in cell apoptosis and carcinogenesis." *Histol Histopathol* **21**: 533-540.
- Liao, Y., G. K. Smyth and W. Shi (2014). "featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features." *Bioinformatics* **30**(7): 923-930.
- Lidani, K. C. F., L. Bavia, A. R. Ambrosio and I. J. de Messias-Reason (2017). "The Complement System: A Prey of Trypanosoma cruzi." *Frontiers in Microbiology* **8**: 607.
- Liou, Y. J., Y. Bai, E. Lin, J. Y. Chen, T. T. Chen, C. J. Hong and S. J. Tsai (2012). "Gene-gene interactions of the INSIG1 and INSIG2 in metabolic syndrome in schizophrenic patients treated with atypical antipsychotics." *The Pharmacogenomics Journal* **12**: 54-61.
- Liu, J. P. (2009). "New functions of cholesterol binding proteins." *Molecular and Cellular Endocrinology* **303**: 1-6.
- Loftus, R. M. and D. K. Finlay (2016). "Immunometabolism: Cellular Metabolism Turns Immune Regulator." *The Journal of Biological Chemistry* **291**(1): 1-10.
- Loftus, R. T., D. E. MacHugh, D. G. Bradley, P. M. Sharp and P. Cunningham (1994). "Evidence for two independent domestications of cattle." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**(7): 2757-2761.
- Loken, M. R., V. O. Shah, K. L. Dattilio and C. I. Civin (1987). "Flow cytometric analysis of human bone marrow: I. Normal erythroid development." *Blood* **69**(1): 255-263.
- Luckins, A. G. and D. Mehlitz (1978). "Evaluation of an indirect fluorescent antibody test, enzyme-linked immunosorbent assay and quantification of immunoglobulins in the diagnosis of bovine trypanosomiasis." *Trop Anim Health Prod* **10**(3): 149-159.
- Lutje, V., B. Mertens, A. Boulange, D. J. Williams and E. Authie (1995). "Trypanosoma congolense: proliferative responses and interleukin production in lymph node cells of infected cattle." *Experimental Parasitology* **81**: 154-164.
- Lutje, V., K. Taylor, A. Boulange and E. Authie (1995). "Trypanosoma congolense: tissue distribution of long-term T- and B-cell responses in cattle." *Immunol Lett* **48**: 29-34.
- Lutje, V., K. Taylor, D. Kennedy, E. Authie, A. Boulange and G. Gettinby (1996). "Trypanosoma congolense: a comparison of T-cell-mediated responses in lymph nodes of trypanotolerant and trypanosusceptible cattle during primary infection." *Experimental Parasitology* **84**: 320-329.
- Mabbott, N. A., I. Sutherland and J. M. Sternberg (1994). "Trypanosoma brucei is protected from the cytostatic effects of nitric oxide under in vivo conditions." *Parasitol Res* **80**: 687-690.
- MacHugh, D. E., M. Shriver, R. T. Loftus, P. Cunningham and D. G. Bradley (1997). "Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of taurine and zebu cattle (Bos taurus and Bos indicus)." *Genetics* **146**: 1071-1086.
- Mack, R. (1970). "The great African cattle plague epidemic of the 1890's." *Tropical Animal Health and Production* **2**(4): 210-219.

- Magez, S., M. Radwanska, M. Drennan, L. Fick, T. N. Baral, N. Allie, M. Jacobs, S. Nedospasov, F. Brombacher, B. Ryffel and P. De Baetselier (2007). "Tumor necrosis factor (TNF) receptor-1 (TNFp55) signal transduction and macrophage-derived soluble TNF are crucial for nitric oxide-mediated *Trypanosoma congolense* parasite killing." J Infect Dis **196**(6): 954-962.
- Magez, S., M. Radwanska, M. Drennan, L. Fick, T. N. Baral, F. Brombacher and P. De Baetselier (2006). "Interferon-gamma and nitric oxide in combination with antibodies are key protective host immune factors during *trypanosoma congolense* Tc13 Infections." J Infect Dis **193**(11): 1575-1583.
- Magez, S., A. Schwegmann, R. Atkinson, F. Claes, M. Drennan, P. De Baetselier and F. Brombacher (2008). "The Role of B-cells and IgM Antibodies in Parasitemia, Anemia, and VSG Switching in *Trypanosoma brucei*-Infected Mice." PLOS Pathogens **4**(8): e1000122.
- Maghazachi, A. A., A. al-Aoukaty and T. J. Schall (1994). "C-C chemokines induce the chemotaxis of NK and IL-2-activated NK cells. Role for G proteins." J Immunol **153**(11): 4969-4977.
- Maher, K., B. Jeric Kokelj, M. Butinar, G. Mikhaylov, M. Mancek-Keber, V. Stoka, O. Vasiljeva, B. Turk, S. A. Grigoryev and N. Kopitar-Jerala (2014). "A role for stefin B (cystatin B) in inflammation and endotoxemia." The Journal of Biological Chemistry **289**(46): 31736-31750.
- Malu, M. N. and H. Tabel (1986). "The alternative pathway of complement in sheep during the course of infection with *Trypanosoma congolense* and after Berenil treatment." Parasite Immunology **8**: 217-229.
- Mansfield, J. M. (1990). "Immunology of African trypanosomiasis." W. H. Freeman and Company: 222-246.
- Mantovani, A., S. A. and M. Locati (2005). "Macrophage polarization comes of age." Immunity **23**(4): 344-346.
- Mantovani, A., A. Sica, S. Sozzani, P. Allavena, A. Vecchi and M. Locati (2004). "The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization." TRENDS in Immunology **25**(12): 677-686.
- Marques, N., Catherine Terret and P. A. Cassier (2015). "Rôle des monocytes et macrophages dans le microenvironnement tumoral " Correspondances en Onco-Thérano **4**(2): 60-64.
- Martinez, F. O. and S. Gordon (2014). "The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment." F1000prime reports **6**(13): 6-13.
- Matthews, K. R., R. McCulloch and L. J. Morrison (2015). "The within-host dynamics of African trypanosome infections." Phil.Trans. R. Soc. B **370**(1675): 20140288.
- Mattioli, R. C., G. Hendrickx, W. Wint, J. Jannin and J. F. U. Slingenbergh (2004). "Tsetse and trypanosomiasis intervention policies supporting sustainable animal-agricultural development." Food Agric Environ. **2**(2): 310-314.
- Maudlin, I., P. H. Holmes and M. Miles (2004). The trypanosomiases. CABI Publishing : 624.
- Maxwell, M. A. and G. E. O. Muscat (2006). "The NR4A subgroup: immediate early response genes with pleiotropic physiological roles." Nuclear receptor signaling **4**: e002-e002.
- McCarthy, D. J., Y. Chen and G. K. Smyth (2012). "Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation." Nucleic Acids Res. **40**(10): 4288-4297.

- McGettrick, A. F. and L. A. O'Neill (2013). "How metabolism generates signals during innate immunity and inflammation." The Journal of Biological Chemistry **288**(32): 22893-22898.
- Meadow, R. H. (1993). Animal domestication in the Middle East: a revised view from the eastern margin, Harappan Civilization, 2nd edition, G. Possehl (ed.), New Dehli : Oxford & IBH : 295-320.
- Mertens, B., K. Taylor, C. Muriuki and M. Rocchi (1999). "Cytokine mRNA Profiles in Trypanotolerant and Trypanosusceptible Cattle Infected with the Protozoan Parasite *Trypanosoma congolense*: Protective Role for Interleukin-4?" Journal of Interferon & Cytokine Research **19**(1): 59-65.
- Metcalf, S. M. (2011). "LIF in the regulation of T-cell fate and as a potential therapeutic." Genes and Immunity **12**: 157-168.
- Meyer, A., H. R. Holt, R. Selby and J. Guitian (2016). "Past and Ongoing Tsetse and Animal Trypanosomiasis Control Operations in Five African Countries: A Systematic Review." PLOS Neglected Tropical Diseases **10**(12): e0005247.
- Michalek, R. D., V. Gerriets, S. R. Jacobs, A. N. Macintyre, N. J. MacIver, E. F. Mason, S. A. Sullivan, A. G. Nichols and J. C. Rathmell (2011). "Cutting edge: distinct glycolytic and lipid oxidative metabolic programs are essential for effector and regulatory CD4+ T cell subsets." the Journal of Immunology **186**(6): 3299–3303.
- Mills, C. D., K. Kincaid, J. M. Alt, M. J. Heilman and A. M. Hill (2000). "M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm." The Journal of Immunology **164**(12): 6166-6173.
- Mills, E. L., B. Kelly and L. A. J. O'Neill (2017). "Mitochondria are the powerhouses of immunity." Nature Immunology **18**: 488.
- Ministère de l'Agriculture, d. l. E. e. d. l. P. (2002). Etat des ressources zoogénétiques. Rapport national Abomey-Calavi, Benin: 71.
- Mishra, D., S. Singh and G. A.-O. Narayan (2016). "Role of B Cell Development Marker CD10 in Cancer Progression and Prognosis." Molecular Biology International **2016**: 9.
- Moazami Goudarzi, K., D. M. A. Belemsaga, G. Ceriotti, D. Laloë, F. Fagbohoun, N. T. Kouagou, I. Sidibé, V. Codjia, M. C. Crimella, F. Grosclaude and S. Touré (2001). "Caractérisation de la race bovine Somba à l'aide de marqueurs moléculaires." Revue d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux **54**(2): 129-138.
- Modolell, M., I. Corraliza, F. Link, G. Soler and K. Eichmann (1995). "Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines." Eur. J. Immunol. **25**: 1101-1104.
- Moloo, S. K. (2011). "The distribution of Glossina species in Africa and their natural hosts." International Journal of Tropical Insect Science **14**(4): 511-527.
- Morias, Y., C. Abels, D. Laoui, E. Van Overmeire, M. Guilliams, E. Schouppe, F. Tacke, C. J. deVries, P. De Baetselier and A. Beschin (2015). "Ly6C- Monocytes Regulate Parasite-Induced Liver Inflammation by Inducing the Differentiation of Pathogenic Ly6C+ Monocytes into Macrophages." PLoS Pathog **11**(5): e1004873.
- Morrison, L. J., A. Tweedie, A. Black, G. L. Pinchbeck, R. M. Christley, A. Schoenefeld, C. Hertz-Fowler, A. MacLeod, C. M. Turner and A. Tait (2009). "Discovery of mating in the major African livestock pathogen *Trypanosoma congolense*." PLoS One **4**(5): e5564.
- Morrison, L. J., L. Vezza, T. Rowan and J. C. Hope (2016). "Animal African Trypanosomiasis: Time to Increase Focus on Clinically Relevant Parasite and Host Species." Trends Parasitol **32**(8): 599-607.

- Mou, Z., P. Jia, S. Kuriakose, F. Khadem and J. E. Uzonna (2010). "Interleukin-17-mediated control of parasitemia in experimental *Trypanosoma congolense* infection in mice." Infection and immunity **78**(12): 5271–5279.
- Mugnier, M. R., G. A. Cross and F. N. Papavasiliou (2015). "The in vivo dynamics of antigenic variation in *Trypanosoma brucei*." Science **347**(6229): 1470–1473.
- Mulandane, F. C., J. Fafetine, J. Van Den Abbeele, P.-H. Clausen, A. Hoppenheit, G. Cecchi, M. Oosthuizen, V. Delespaux and L. Neves (2018). "Resistance to trypanocidal drugs in cattle populations of Zambezia Province, Mozambique." Parasitology Research **117**(2): 429-436.
- Munder, M., K. Eichmann and M. Modolell (1998). "Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4+ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype." The Journal of Immunology **160**: 5347-5354.
- Munder, M., K. Eichmann, J. M. Moran, F. Centeno, G. Soler and M. Modolell (1999). "Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells." The Journal of Immunology **163**: 3771-3777.
- Muranjan, M., Q. Wang, Y. L. Li, E. Hamilton, F. P. Otieno-Omondi, J. Wang, A. Van Praagh, J. G. Grootenhuys and S. J. Black (1997). "The trypanocidal Cape buffalo serum protein is xanthine oxidase." Infection and Immunity: 3806–3814.
- Murphy, J. E., P. R. Tedbury, S. Homer-Vanniasinkam, J. H. Walker and S. Ponnambalam (2005). "Biochemistry and cell biology of mammalian scavenger receptors." Atherosclerosis **182**(1): 1-15.
- Murray, M., D. J. Clifford, G. Gettinby, W. F. Snow and W. I. McIntyre (1981). "Susceptibility to African trypanosomiasis of N'Dama and Zebu cattle in an area of *Glossina morsitans submorsitans* challenge." Vet Rec **109**(23): 503-510.
- Murray, M., D. J. Clifford and W. I. McIntyre (1979). "Diagnosis of African trypanosomiasis in the bovine." Trans R Soc Trop Med Hyg **73**(1): 120-121.
- Murray, M., W. I. Morrison and D. D. Whitelaw (1982). Host Susceptibility to African Trypanosomiasis: Trypanotolerance. Advances in Parasitology. J. R. Baker and R. Muller, Academic Press. **21**: 1-68.
- Murray, M., P. K. Murray and W. I. M. McIntyre (1977). "An improved parasitological technique for the diagnosis of African trypanosomiasis." Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene **71**(4): 325-326.
- Murray, M., J. Trail and G. D. D'Ieteren (1990). "Trypanotolerance in cattle and prospects for the control of trypanosomiasis by selective breeding." Rev Sci Tech **9**(2): 369-386.
- Murray, M., J. C. Trail, C. E. Davis and S. J. Black (1984). "Genetic resistance to African Trypanosomiasis." The Journal of Infectious Diseases **149**(3): 311-319.
- Murray, P. J. and T. A. Wynn (2011). "Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization." Journal of Leukocyte Biology **89**(4): 557-563.
- Mwai, O., O. Hanotte, Y.-J. Kwon and S. Cho (2015). "African Indigenous Cattle: Unique Genetic Resources in a Rapidly Changing World." Asian-Australasian Journal of Animal Sciences **28**(7): 911-921.
- Naessens, J. (2006). "Bovine trypanotolerance: A natural ability to prevent severe anaemia and haemophagocytic syndrome?" Int J Parasitol **36**(5): 521-528.

- Naessens, J., L. Sg., D. J. Kennedy, S. J. Kemp and A. J. Teale (2003). "Responses of bovine chimaeras combining trypanosomosis resistant and susceptible genotypes to experimental infection with *Trypanosoma congolense*." Veterinary Parasitology **111**: 125–142.
- Naessens, J., A. Teale and M. Sileghem (2002). "Identification of mechanisms of natural resistance to African trypanosomiasis in cattle." Veterinary Immunology and Immunopathology **87**: 187-194.
- Naessens, J. and D. J. Williams (1992). "Characterization and measurement of CD5+ B cells in normal and *Trypanosoma congolense*-infected cattle." Eur. J. Immunol. **22**: 1713-1718.
- Nagase, H. and J. F. Woessner, Jr. (1999). "Matrix metalloproteinases." The Journal of Biological Chemistry **274**(31): 21491–21494.
- Nantulya, V. M. (1990). "Trypanosomiasis in domestic animals: the problems of diagnosis." Rev. sci. tech **9**(2): 357-367.
- Nayak, R. c., L. R. Trump, L. Trump, B. J. Aronow, K. Myers, P. Mehta, T. Kalfa, A. M. Wellendorf, C. A. Valencia, P. J. Paddison, M. S. Horwitz, H. L. Grimes, C. Lutzko and J. A. Cancelas (2015). "Pathogenesis of ELANE-mutant severe neutropenia revealed by induced pluripotent stem cells." The Journal of Clinical Investigation **125**(8): 3103-3116.
- Newsholme, P., R. Curi, S. Gordon and E. A. Newsholme (1986). "Metabolism of glucose, glutamine, long-chain fatty acids and ketone bodies by murine macrophages." Biochemical Journal **239**(1): 121.
- Nielsen, K., J. Sheppard, W. Holmes and I. Tizard (1978). "Experimental bovine trypanosomiasis. Changes in serum immunoglobulins, complement and complement components in infected animals." Immunology **35**(5): 817-826.
- Noel, W., G. Hassanzadeh, G. Raes, B. Namangala, I. Daems, L. Brys, F. Brombacher, P. D. Baetselier and A. Beschin (2002). "Infection Stage-Dependent Modulation of Macrophage Activation in *Trypanosoma congolense*-Resistant and -Susceptible Mice." Infection and Immunity **70**(11): 6180-6187.
- Nok, A., I. Nock and J. J. Bonire (2003). "The cholesterol pathway of *Trypanosoma congolense* could be a target for triphenyltin salicylate and triphenylsilyl salicylate inhibition." Applied Organometallic Chemistry **17**: 17-22.
- Norata, G. D., G. Caligiuri, T. Chavakis, G. Matarese, M. G. Netea, A. Nicoletti, L. A. O'Neill and F. M. Marelli-Berg (2015). "The Cellular and Molecular Basis of Translational Immunometabolism." Immunity **43**: 421-434.
- Nowyhed, H. N., T. R. Huynh, A. Blatchley, R. Wu, G. D. Thomas and C. C. Hedrick (2015). "The nuclear receptor nr4a1 controls CD8 T cell development through transcriptional suppression of runx3." Scientific Reports **5**: 9059.
- Noyes, H., A. Brass, I. Obara, S. Anderson, A. L. Archibald, D. G. Bradley, P. Fisher, A. Freeman, J. Gibson, M. Gicheru, L. Hall, O. Hanotte, H. Hulme, D. McKeever, C. Murray, S. J. Oh, C. Tate, K. Smith, M. Tapio, J. Wambugu, D. J. Williams, M. Agaba and S. J. Kemp (2011). "Genetic and expression analysis of cattle identifies candidate genes in pathways responding to *Trypanosoma congolense* infection." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **108**(22): 9304-9309.
- O'Gorman, G. M., S. D. Park, E. W. Hill, K. G. Meade, P. M. Coussens, M. Agaba, J. Naessens, S. J. Kemp and D. E. MacHugh (2009). "Transcriptional profiling of cattle infected with *Trypanosoma congolense* highlights gene expression signatures underlying trypanotolerance and trypanosusceptibility." BMC Genomics **10**: 207.

- O'Gorman, G. M., S. D. Park, E. W. Hill, K. G. Meade, L. C. Mitchell, M. Agaba, J. P. Gibson, O. Hanotte, J. Naessens, S. J. Kemp and D. E. MacHugh (2006). "Cytokine mRNA profiling of peripheral blood mononuclear cells from trypanotolerant and trypanosusceptible cattle infected with *Trypanosoma congolense*." *Physiol Genomics* **28**(1): 53-61.
- O'Neill, L. A. J., R. J. Kishton and J. Rathmell (2016). "A guide to immunometabolism for immunologists." *Nature reviews. Immunology* **16**(9): 553-565.
- Obermajer, N., U. Švajger, M. Bogyo, M. Jeras and J. Kos (2008). "Maturation of dendritic cells depends on proteolytic cleavage by cathepsin X." *Journal of Leukocyte Biology* **84**(5): 1306-1315.
- Onyilagha, C., P. Jia, N. Jayachandran, S. Hou, I. Okwor, S. Kuriakose, A. Marshall and J. E. Uzonna (2015). "The B cell adaptor molecule Bam32 is critically important for optimal antibody response and resistance to *Trypanosoma congolense* infection in mice." *PLoS Negl Trop Dis* **9**(4): e0003716.
- Onyilagha, C., S. Kuriakose, N. Ikeogu, P. Jia and J. Uzonna (2018). "Myeloid-Derived Suppressor Cells Contribute to Susceptibility to *Trypanosoma congolense* Infection by Suppressing CD4 T Cell Proliferation and IFN- γ Production." *J Immunol* **201**(2): 507-515.
- Opperdoes, F., P. Borst and K. Fonck (1976). "The potential use of inhibitors of glycerol-3-phosphate oxidase for chemotherapy of African trypanosomiasis." *FEBS Letters* **62**(2).
- Ormerod, W. E. and S. Venkatesan (1982). "Similarities of lipid metabolism in mammalian and protozoan cells: an evolutionary hypothesis for the prevalence of atheroma." *Microbiological reviews* **46**(3): 296-307.
- Osaer, S., B. Goossens, D. J. Clifford, S. Kora and M. Kassama (1994). "A comparison of the susceptibility of Djallonke sheep and West African Dwarf goats to experimental infection with two different strains of *Trypanosoma congolense*." *Vet Parasitol* **51**(3-4): 191-204.
- Paillard, F., G. Sterkers and C. Vaquero (1990). "Transcriptional and post-transcriptional regulation of TcR, CD4 and CD8 gene expression during activation of normal human T lymphocytes." *The EMBO Journal* **9**(6): 1867-1872.
- Paling, R. W., S. K. Moloo, J. R. Scott, G. Gettinby, F. A. McOdimba and M. A. X. Murray (1991). "Susceptibility of N'Dama and Boran cattle to sequential challenges with tsetse-transmitted clones of *Trypanosoma congolense*." *Parasite Immunology* **13**(4): 427-445.
- Paris, J., M. Murray and F. McOdimba (1982). "A comparative evaluation of the parasitological techniques currently available for the diagnosis of African trypanosomiasis in cattle." *Acta Trop* **39**(4): 307-316.
- Parks, W. C., C. Wilson and Y. S. Lopez-Boado (2004). "Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity." *Nature Reviews Immunology* **4**: 617-619.
- Patterson, N., A. Price and D. Reich (2006). "Population structure and eigenanalysis." *PLoS genetics* **2**(12): e190.
- Payne, W. J. A. and J. Hodges (1997). *Tropical cattle : origins, breeds, and breeding policies*. Tropical Agriculture; Wiley-Blackwell; 1 edition.
- Pays, E. (1990). "L'expression des gènes d'antigène variable chez les trypanosomes africains." *médecine/sciences* **6**: 510-516.
- Pays, E. (1990). "Variation antigénique des trypanosomes africains." *Ann Parasitol Hum Comp* **65** (Suppl 1): 5-10.
- Pays, E. and M. Berberof (1995). "Antigènes variables et non variables des trypanosomes africains." *médecine/sciences* **11**: 261-267.

- Peacock, L., S. Cook, V. Ferris, M. Bailey and W. Gibson (2012). "The life cycle of *Trypanosoma (Nannomonas) congolense* in the tsetse fly." Parasit Vectors **5**: 109.
- Peet, D. J., B. Janowski and D. J. Mangelsdorf (1998). "The LXRs: a new class of oxysterol receptors." Curr Opin Genet Dev **8**(5): 571-575.
- Pello, O. M., M. De Pizzol, M. Mirolo, L. Soucek, L. Zammataro, A. Amabile, A. Doni, M. Nebuloni, L. B. Swigart, G. I. Evan, A. Mantovani and M. Locati (2012). "Role of c-MYC in alternative activation of human macrophages and tumor-associated macrophage biology." Blood **119**(2): 411.
- Peregrine, A. S., G. Knowles, A. I. Ibitayo, J. R. Scott, S. K. Moloo and N. B. Murphy (1991). "Variation in resistance to isometamidium chloride and diminazene aceturate by clones derived from a stock of *Trypanosoma congolense*." Parasitology **102**(1): 93-100.
- Peterlongo, P. (2016). "Lire les lectures : analyse de données de séquençage", Atlantique, I.R.B., ed: 87.
- Phan, U. T., B. Arunachalam and P. Cresswell (2000). "Gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase (GILT). Maturation, activity, and mechanism of action." The Journal of Biological Chemistry **275**(34): 25907-25914.
- Pinder, M., J. Bauer, A. Van Melick and F. Fumoux (1988). "Immune responses of trypanoresistant and trypanosusceptible cattle after cyclic infection with *Trypanosoma congolense*." Veterinary Immunology and Immunopathology, **18**: 245-257.
- Porter, V. (1991). Cattle: a handbook to the breeds of the world. Ramsbury, United Kingdom; The Crowood Press Ltd : 400.
- Raingaud, J., S. Gupta, J. S. Rogers, M. Dickens, J. Han, R. J. Ulevitch and R. J. Davis (1995). "Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine." The Journal of Biological Chemistry **270**(13): 7420-7426.
- Rege, J. E. O., G. S. Aboagye and C. L. Tawah (1994). "Shorthorn cattle of West and Central Africa I. Origin, distribution, classification and population statistics." World Animal Review **78**: 1-26.
- Rege, J. E. O., G. S. Aboagye and C. L. Tawah (1994). "Shorthorn cattle of west and central Africa II. Ecological settings, utility, management and production systems." World Animal Review **78**(1): 14-21.
- Rege, J.E.O. (1999). "The state of African cattle genetic resources I. Classification framework and identification of threatened and extinct breeds". AGRI **25**: 1-25.
- Rege, J. E. O. and C. L. Tawah (1999). "The state of African cattle genetic resources II. Geographical distribution, characteristics and uses of present-day breeds and strains." Animal Genetic Resources Information **26**: 1-25.
- Reinitz, D. M. and J. M. Mansfield (1990). "T-cell-independent and T-cell-dependent B-cell responses to exposed variant surface glycoprotein epitopes in trypanosome-infected mice." Infection and Immunity **58**(7): 2337-2342.
- Renaudeau, D., A. Collin, S. Yahav, V. de Basilio, J. L. Gourdine and R. J. Collier (2012). "Adaptation to hot climate and strategies to alleviate heat stress in livestock production." Animal **6**(5): 707-728.
- Režen, T., I. Ogris, M. Sever, F. Merzel, S. Golic Grdadolnik and D. Rozman (2017). "Evaluation of Selected CYP51A1 Polymorphisms in View of Interactions with Substrate and Redox Partner." Frontiers in pharmacology **8**: 417-417.

- Ricklin, D., G. Hajishengallis, K. Yang and J. D. Lambris (2010). "Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis." Nat Immunol **11**(9): 785–797.
- Risco, A. and A. Cuenda (2012). "New Insights into the p38 γ and p38 δ MAPK Pathways." Journal of signal transduction **2012**: 8.
- Ritchie, M. E., B. Phipson, D. Wu, Y. Hu, C. W. Law, W. Shi and G. K. Smyth (2015). "limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies." Nucleic Acids Res **43**(7): e47.
- Robinson, M. D., D. J. McCarthy and G. K. Smyth (2010). "edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data." Bioinformatics **26**(1): 139-140.
- Rodriguez-Prados, J. C., P. G. Traves, J. Cuenca, D. Rico, J. Aragonés, P. Martín-Sanz, M. Cascante and L. Bosca (2010). "Substrate fate in activated macrophages: a comparison between innate, classic, and alternative activation." The Journal of Immunology **185**: 605-614.
- Roelants, G. E., I. Tamboura, D. B. Sidiki, D. Sidiki, A. Bassinga and M. Pinder (1983). "Trypanotolerance. an individual not a breed character." Acta Trop **40**(2): 99-104.
- Roger, F. L., P. Solano, J. Bouyer, V. Porphyre, D. Berthier, M. Peyre and P. Bonnet (2017). "Advocacy for identifying certain animal diseases as “neglected”." PLOS Neglected Tropical Diseases **11**(9): e0005843.
- Rotllan, N. and C. Fernandez-Hernando (2012). "MicroRNA Regulation of Cholesterol Metabolism." Cholesterol **2012**: 8.
- Rotureau, B. and J. Van Den Abbeele (2013). "Through the dark continent: African trypanosome development in the tsetse fly." Front Cell Infect Microbiol **3**: 53.
- Rouse, J., P. Cohen, S. Trigon, M. Morange, A. Alonso-Llamazares, D. Zamanillo, T. Hunt and A. R. Nebreda (1994). "A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins." Cell **78**(6): 1027-1037.
- Roux, P. and J. Blenis (2004). "ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions." Microbiology and Molecular Biology Reviews **68**(2): 320.
- Rouzer, C. and A. Cerami (1980). "Hypertriglyceridemia associated with Trypanosoma brucei infection in rabbits: role of defective triglyceride removal." Molecular and Biochemical Parasitology **2**(1): 31-38.
- Rowlands, G. J., W. Mulatu, G. D. M. D'Ieteren and S. M. Nagda (1995). Evidence of differences in trypanosusceptibility in East African Zebu cattle, Conference paper: OAU/STRC.
- Roy, A., G. Ganesh, H. Sippola, S. Bolin, O. Sawesi, A. Dagälv, S. M. Schlenner, T. Feyerabend, H.-R. Rodewald, L. Kjellén, L. Hellman and M. Åbrink (2014). "Mast cell chymase degrades the alarmins heat shock protein 70, biglycan, HMGB1, and interleukin-33 (IL-33) and limits danger-induced inflammation." The Journal of biological chemistry **289**(1): 237-250.
- Rurangirwa, F., H. Tabel, G. Losos and I. Tizard (1980). "Hemolytic complement and serum C3 levels in Zebu cattle infected with Trypanosoma congolense and Trypanosoma vivax and the effect of trypanocidal treatment." Infect Immun **27**(3): 832-836.
- Sasaki, M. M., A. Skol, E. A. Hungate, R. Bao, L. Huang, S. A. Kahn, J. M. Allan, S. R. Brant, D. P. B. McGovern, I. Peter, M. S. Silverberg, J. H. Cho, B. S. Kirschner and K. Onel

- (2015). "Whole-exome Sequence Analysis Implicates Rare IL17REL Variants in Familial and Sporadic Inflammatory Bowel Disease." Inflamm Bowel Dis **22**(1): 20-27.
- Scheller, J., A. Chalaris, D. Schmidt-Arras and S. Rose-John (2011). "The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6." Biochim Biophys Acta **1813**(5): 878-888.
- Schlotterer, C. (2003). "Hitchhiking mapping--functional genomics from the population genetics perspective." Trends Genet **19**(1): 32-38.
- Schultz, H., J. Hume, D. S. Zhang, T. L. Gioannini and J. P. Weiss (2007). "A novel role for the bactericidal/permeability increasing protein in interactions of gram-negative bacterial outer membrane blebs with dendritic cells." The Journal of Immunology **179**(4): 2477-2484.
- Schultze, S. M., B. A. Hemmings, M. Niessen and O. Tschopp (2012). "PI3K/AKT, MAPK and AMPK signalling: protein kinases in glucose homeostasis." Expert Rev Mol Med **14**: e1.
- Sempere, G., F. Philippe, A. Dereeper, M. Ruiz, G. Sarah and P. Larmande (2016). "Gigwa-Genotype investigator for genome-wide analyses." GigaScience **5**: 25.
- Shaw, A. P., G. Cecchi, G. R. Wint, R. C. Mattioli and T. P. Robinson (2014). "Mapping the economic benefits to livestock keepers from intervening against bovine trypanosomiasis in Eastern Africa." Prev Vet Med **113**(2): 197-210.
- Shaw, A. P. M. (2004). Economics of African Trypanosomiasis. The trypanosomiasis. I. Maudlin, P. H. Holmes and M. Miles, CABI Publishing **1**: 624.
- Shi, L. Z., R. Wang, G. Huang, P. Vogel, G. Neale, D. R. Green and H. Chi (2011). "HIF1alpha-dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of TH17 and Treg cells." The Journal of experimental medicine **208**(7): 1367-1376.
- Shiota, C., J.-T. Woo, J. Lindner, K. D. Shelton and M. A. Magnuson (2006). "Multiallelic Disruption of the rictor Gene in Mice Reveals that mTOR Complex 2 Is Essential for Fetal Growth and Viability." Developmental Cell **11**(4): 583-589.
- Sidibé, I. (1997). Variabilité génétique de *Trypanosoma congolense*, agent de la trypanosomose animale : implications taxonomiques et épidémiologiques. Thèse de doctorat, Biologie de l'évolution et écologie; Biologie des systèmes intégrés Agronomie Ecologie Université de Montpellier II : 175.
- Sileghem, M. and J. N. Flynn (1992). "Suppression of interleukin 2 secretion and interleukin 2 receptor expression during tsetse-transmitted trypanosomiasis in cattle." Eur J Immunol **22**(3): 767-773.
- Smith, J. and J. Haigh (1974). "The hitch-hiking effect of a favourable gene." Genet Res **23**(1): 23-35.
- Smith, T. K. and P. Bütikofer (2010). "Lipid metabolism in *Trypanosoma brucei*." Molecular and biochemical parasitology **172**(2): 66-79.
- Solano, P. (1998). Implications épidémiologiques de la variabilité génétique des populations de glossines : cas de *Glossina palpalis* en Afrique de l'Ouest. Thèse de doctorat, USTL, Montpellier : 207.
- Solano, P., R. S. and T. de Meeus (2010). "How can tsetse population genetics contribute to African trypanosomiasis control?" Cell **26**(5): 255-263.
- Solano, P., I. Sidibe and B. Rotureau (2017). Les glossines (Diptera : Glossinidae). Entomologie médicale et vétérinaire IRD Éditions: 367-389
- Somda, M. B., Z. Bengaly, E. Dama, A. Poinsignon, G.-K. Dayo, I. Sidibe, F. Remoue, A. Sanon and B. Bucheton (2013). "First insights into the cattle serological response to tsetse

- salivary antigens: a promising direct biomarker of exposure to tsetse bites." Veterinary Parasitology **197**: 332–340.
- Sternberg, J., N. Mabbott, I. Sutherland and F. Y. Liew (1994). "Inhibition of nitric oxide synthesis leads to reduced parasitemia in murine *Trypanosoma brucei* infection." Infection and immunity **62**(5): 2135-2137.
- Sternberg, M. J. and N. A. Mabbott (1996). "Nitric oxide-mediated suppression of T cell responses during *Trypanosoma brucei* infection: soluble trypanosome products and interferon-gamma are synergistic inducers of nitric oxide synthase." Eur. J. Immunol. **26**: 539-543.
- Sternlicht, M. D. and Z. Werb (2001). "How matrix metalloproteinases regulate cell behavior." Annu Rev Cell Dev Biol **17**: 463–516.
- Stijlemans, B., L. Leng, L. Brys, A. Sparkes, L. Vansintjan, G. Caljon, G. Raes, J. Van Den Abbeele, J. A. Van Ginderachter, A. Beschin, R. Bucala and P. De Baetselier (2014). "MIF Contributes to *Trypanosoma brucei* Associated Immunopathogenicity Development." PLOS Pathogens **10**(9): e1004414.
- Sullivan, J. J. and K. S. Goh (2008). "Environmental fate and properties of pyriproxyfen." Journal of Pesticide Science **33**(4): 339-350.
- Sun, L.-P., J. Seemann, J. L. Goldstein and M. S. Brown (2007). "Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: Insig renders sorting signal in Scap inaccessible to COPII proteins." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **104**(16): 6519-6526.
- Tabel, H., G. J. Losos and M. G. Maxie (1980). "Experimental bovine trypanosomiasis (*Trypanosoma vivax* and *T. congolense*). II. Serum levels of total protein, albumin, hemolytic complement, and complement component C3." Tropenmed Parasitol. **31**(1): 99-104.
- Takeet, M. and B. Fagbemi (2009). "Haematological, pathological and plasma biochemical changes in rabbits experimentally infected with *Trypanosoma congolense*." Science World Journal **4**(2): 29-36
- Tanaka, T., M. Narazaki and T. Kishimoto (2014). "IL-6 in inflammation, immunity, and disease." Cold Spring Harb Perspect Biol **6**(10): a016295.
- Taylor, K., B. E. A. Mertens, V. Lutje and R. Saya (1998). "*Trypanosoma congolense* infection of trypanotolerant N'Dama (*Bos taurus*) cattle is associated with decreased secretion of nitric oxide by interferon- γ -activated monocytes and increased transcription of interleukin-10." Parasite Immunology **20**(9): 421-429.
- Taylor, K., L. V. and B. Mertens (1996). "Nitric oxide synthesis is depressed in *Bos indicus* cattle infected with *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma vivax* and does not mediate T-cell suppression." Infect Immun **64**(10): 4115-4122.
- Taylor, K. A. (1998). "Immune responses of cattle to African trypanosomes: protective or pathogenic?" International Journal for Parasitology **28**(2): 219-240.
- Taylor, K. A., V. Lutje, D. Kennedy, E. Authie, A. Boulange, L. Logan-Henfrey, B. Gichuki and G. Gettinby (1996). "*Trypanosoma congolense*: B-lymphocyte responses differ between trypanotolerant and trypanosusceptible cattle." Experimental Parasitology **83**(54): 106-116.
- Taylor, K. A. and B. Mertens (1999). "Immune Response of Cattle Infected with African Trypanosomes." Memórias do Instituto Oswaldo Cruz **94**(2): 239-244.
- Tchamdja, E., A. E. Kulo, K. Akoda, A. Teko-Agbo, A. M. Assoumy, E. M. Niang, K. Batawui, K. Adomefa, A. A. Bankole, K. Kombiagou, A. Hoppenheit, P. H. Clausen, R. C. Mattioli,

- R. Peter, G. B. Napier, R. De Deken, T. Marcotty, J. Van Den Abbeele and V. Delespaux (2016). "Drug quality analysis through high performance liquid chromatography of isometamidium chloride hydrochloride and diminazene diacetate purchased from official and unofficial sources in Northern Togo." Prev Vet Med **126**: 151-158.
- Thevenon, S., G. K. Dayo, S. Sylla, I. Sidibe, D. Berthier, H. Legros, D. Boichard, A. Eggen and M. Gautier (2007). "The extent of linkage disequilibrium in a large cattle population of western Africa and its consequences for association studies." Anim Genet **38**(3): 277-286.
- Thuong, N. T. T., T. T. B. Tram, T. D. Dinh, P. V. K. Thai, D. Heemskerk, N. D. Bang, T. T. H. Chau, D. G. Russell, G. E. Thwaites, T. R. Hawn, M. Caws and S. J. Dunstan (2016). "MARCO variants are associated with phagocytosis, pulmonary tuberculosis susceptibility and Beijing lineage." Genes And Immunity **17**: 419.
- Torr, S. J., I. Maudlin and G. A. Vale (2007). "Less is more: restricted application of insecticide to cattle to improve the cost and efficacy of tsetse control." Medical and Veterinary Entomology **21**: 53-64.
- Trail, J. C., G. D. D'Ieteren, J. C. Maille and G. Yangari (1991). "Genetic aspects of control of anaemia development in trypanotolerant N'Dama cattle." Acta Trop **48**(4): 285-291.
- Traore-Leroux, T., F. Fumoux and M. Pinder (1987). "High density lipoprotein levels in the serum of trypanosensitive and trypanoresistant cattle. Changes during Trypanosoma congolense infection." Acta Tropica **44**(3): 315-323.
- Tsai, S., X. Clemente-Casares, A. C. Zhou, H. Lei, J. J. Ahn, Y. T. Chan, O. Choi, H. Luck, M. Woo, S. E. Dunn, E. G. Engleman, T. H. Watts, S. Winer and D. A. Winer (2018). "Insulin Receptor-Mediated Stimulation Boosts T Cell Immunity during Inflammation and Infection." Cell Metab **28**(6): 922-934.
- Uilenberg, G. and W. P. Boyt (1998). "A Field Guide for Diagnosis, Treatment and Prevention of African Animal Trypanosomosis." Food and Agriculture Organization of the United Nations: 10.
- Uzonna, J. E., R. Kaushik, J. R. Gordon and H. Tabel (1998). "Immunoregulation in experimental murine Trypanosoma congolense infection: anti-IL-10 antibodies reverse trypanosome-mediated suppression of lymphocyte proliferation in vitro and moderately prolong the lifespan of genetically susceptible BALB/c mice." Parasite immunology **20**: 293-302.
- Van den Bossche, P. (2001). "Some general aspects of the distribution and epidemiology of bovine trypanosomosis in southern Africa." International Journal for Parasitology **31**: 592-598.
- Van den Bossche, P., S. Chitanga, J. Masumu, T. Marcotty and V. Delespaux (2011). "Virulence in Trypanosoma congolense Savannah subgroup. A comparison between strains and transmission cycles." Parasite Immunol **33**(8): 456-460.
- Van der Ploeg, L. H., K. Gottesdiener and M. G. Lee (1992). "Antigenic variation in African trypanosomes." Trends Genet **8**(12): 452-457.
- Van der Ploeg, L., Valerio, D., Lange, T., Bernard, A., Borst, P., Grosveld, F.G. (1982). "An analysis of cosmid clones of nuclear DNA from Trypanosoma brucei shows that the genes for variant surface glycoproteins are clustered in the genome". Nucleic Acids Res. **10**: 5905-5923.
- Van der Waaij, E. H., O. Hanotte, J. A. M. van Arendonk, S. J. Kemp, D. Kennedy, J. P. Gibson and A. Teale (2003). "Population parameters for traits defining trypanotolerance in an F2 cross of N'Dama and Boran cattle." Livestock Production Science **84**(3): 219-230.

- van Hellemond, J. J. and A. G. Tielens (2006). "Adaptations in the lipid metabolism of the protozoan parasite *Trypanosoma brucei*." FEBS Letters **580**: 5552–5558.
- Velculescu, V. E., L. Zhang, B. Vogelstein and K. W. Kinzler (1995). "Serial analysis of gene expression." Science **270**(5235): 484-487.
- Vickerman, K. (1969). "The Fine Structure of *Trypanosoma congolense* in Its Bloodstream Phase." The Journal of Protozoology **16**(1): 54-69.
- Vincendeau, P. and B. Bouteille (2006). "Immunology and immunopathology of African trypanosomiasis." An Acad Bras Cienc **78**(4): 645-665.
- Vincendeau, P., A. P. Gobert, S. Daulouede, D. Moynet and M. D. Mossalayi (2003). "Arginases in parasitic diseases." Trends Parasitol **19**(1): 9-12.
- Vreysen, M. J., M. Seck, B. Sall and J. Bouyer (2012). "Tsetse flies: their biology and control using area-wide integrated pest management approaches." Journal of Invertebrate Pathology **12**: 15-25.
- Wang, F., M. Meng, B. Mo, Y. Yang, Y. Ji, P. Huang, W. Lai, X. Pan, T. You, H. Luo, X. Guan, Y. Deng, S. Yuan, J. Chu, M. Namaka, T. Hughes, L. Ye, J. Yu, X. Li and Y. Deng (2018). "Crosstalks between mTORC1 and mTORC2 variagate cytokine signaling to control NK maturation and effector function." Nature communications **9**(1): 4874-4874.
- Wang, R., C. Dillon, L. Z. Shi, S. Milasta, R. Carter, D. Finkelstein, L. L. McCormick, P. Fitzgerald, H. Chi, J. Munger and D. R. Green (2011). "The transcription factor Myc controls metabolic reprogramming upon T lymphocyte activation." Immunity **35**(6): 871–882.
- Wang, Y., P. M. Rogers, C. Su, G. Varga, K. R. Stayrook and T. P. Burris (2008). "Regulation of cholesterologenesis by the oxysterol receptor, LXRalpha." J Biol Chem **283**(39): 26332-26339.
- Ward, C. W. and M. C. Lawrence (2009). "Ligand-induced activation of the insulin receptor: a multi-step process involving structural changes in both the ligand and the receptor." Bioessays **31**(4): 422-434.
- Weinberg, S. E., L. A. Sena and N. S. Chandel (2015). "Mitochondria in the regulation of innate and adaptive immunity." Immunity **42**(3): 406–417.
- Wellde, B., R. Löttsch, G. Deindl, E. Sadun, J. Williams and G. Warui (1974). "*Trypanosoma congolense*: I. Clinical observations of experimentally infected cattle." Experimental parasitology **36**(1): 6-19.
- Wendorf, F. and R. Schild (1994). "Are the early holocene cattle in the eastern sahara domestic or wild?" Evolutionary Anthropology: Issues, News, and Reviews **3**(4): 118-128.
- White, M. F. (2003). "Insulin signaling in health and disease." Science **302**(5651): 1710-1711.
- Woo, P. T. (1970). "The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomiasis." Acta Trop **27**(4): 384-386.
- Xu, L. L., M. K. Warren, W. L. Rose, W. Gong and J. M. Wang (1996). "Human recombinant monocyte chemotactic protein and other C-C chemokines bind and induce directional migration of dendritic cells in vitro." J Leukoc Biol **60**(3): 365-371.
- Yabe, D., B. M.S. and J. L. Goldstein (2002). "Insig-2, a second endoplasmic reticulum protein that binds SCAP and blocks export of sterol regulatory element-binding proteins." Proc Natl Acad Sci USA **99**(20): 12753-12758.
- Yadav, A., V. Saini and S. Arora (2010). "MCP-1: Chemoattractant with a role beyond immunity: A review." Clinica Chimica Acta **411**(21): 1570-1579.

- Yang, T., P. Espenshade, M. E. Wright, D. Yabe, Y. Gong, R. Aebersold, J. L. Goldstein and M. S. Brown (2002). "Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER." Cell **110**: 489–500.
- Yi, Z., O. Cohen-Barak, N. Hagiwara, P. D. Kingsley, D. A. Fuchs, D. T. Erickson, E. M. Epner, J. Palis and M. H. Brilliant (2006). "Sox6 directly silences epsilon globin expression in definitive erythropoiesis." PLoS genetics **2**(2): e14-e14.
- Yoon, M. S. (2017). "The Role of Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) in Insulin Signaling." Nutrients **9**(11): e1176.
- Yoshimoto, F. K. and R. J. Auchus (2015). "The diverse chemistry of cytochrome P450 17A1 (P450c17, CYP17A1)." The Journal of steroid biochemistry and molecular biology **151**: 52-65.
- Ytournal, F. (2008). Déséquilibre de liaison et cartographie de QTL en population sélectionnée. Thèse de doctorat: Génétique animale, AgroParisTech : 174.
- Yue, X., L. Wu and W. Hu (2015). "The regulation of leukemia inhibitory factor." Cancer cell & microenvironment **2**(3): e877.
- Zarubin, T. and J. Han (2005). "Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway." Cell Res **15**(1): 11-18.

Annexes

Annexe 1 : Article Peylhard *et al.* (en attente de relecture par les coauteurs) "blood transcriptional profiling in cattle."

Annexe 2 : Berthier *et al.* (2015). "A comparison of phenotypic traits related to trypanotolerance in five west african cattle breeds highlights the value of shorthorn taurine breeds."

Annexe 3 : Courtin *et al.* (2015). "Reducing Human-Tsetse Contact Significantly Enhances the Efficacy of Sleeping Sickness Active Screening Campaigns: A Promising Result in the Context of Elimination."

Annexe 4 : Jamonneau *et al.* (2015). "Accuracy of individual rapid tests for serodiagnosis of gambiense sleeping sickness in West Africa."

Annexe 5 : Protocole d'extraction d'ARN à l'aide du kit d'extraction d'ARN Tempus TM Spin (Applied Biosystems, USA)

Annexe 6 : Rapport RNA-Seq orienté n° 4 issu de la plateforme MGX de Montpellier

Annexe 7 : Rapport de la première session ordinaire d'examen de projet du comité d'éthique institutionnel du 31 janvier 2013.

Annexe 8 : Schéma du dispositif expérimental basé au Burkina Faso

Annexe 1

Article Peylhard *et al.* (en attente de relecture par les coauteurs) "blood transcriptional profiling in cattle."

Blood transcriptional profiling in cattle highlights expected modulation of the immune response but overlooked disturbance in metabolism during a *Trypanosoma congolense* infection

Mélanie Moana Peylhard ^{1,2}, **David Berthier** ^{1,2}, **Guiguigbaza-Kossigan Dayo** ^{3,4}, **Isabelle Chantal** ^{1,2}, **Souleymane Sylla** ³, **MGX*2**⁵, **Laurence FLori** ⁶, **Sophie Thévenon** ^{1,2}

¹INTERTRYP, Univ. Montpellier, CIRAD, IRD, Montpellier, France

²CIRAD, UMR INTERTRYP, F-34398 Montpellier, France

³Centre International de Recherche-Développement sur l'Elevage en zone Subhumide (CIRDES), 01 BP 454, Bobo-Dioulasso 01, Burkina Faso

⁴ Département Etudes et Recherches sur les Intrants Agricoles et Règlementations (DRIAR), Institut du Sahel (INSAH/CILSS), Bamako, Mali

⁵MGX-Montpellier GenomiX, c/o Institut de Génomique Fonctionnelle, Montpellier, France

⁶SELMET, INRA, CIRAD, Montpellier SupAgro, Univ. Montpellier, Montpellier, France
MGX

Abstract

African animal trypanosomosis, a disease caused by blood parasites and transmitted by tsetse flies, affects millions of cattle and is a major constraint to livestock development in sub-Saharan Africa. European and indicine breeds are susceptible to the disease and, without treatment, usually die from infection. On the contrary, West African taurine breeds are able to survive to the disease and are called trypanotolerant. The purpose of this study was to improve knowledge in the trypanotolerance by identifying genes and biological functions regulated by cattle breeds during an infection. For that, five West African cattle breeds, three taurine breeds (N'Dama, Laugne and Baoulé), one indicine (Zebu Fulani) and one admixed breed (Borgou) were experimentally infected with *Trypanosoma congolense*, and phenotypic traits were monitored. RNA-seq libraries were constructed from blood samples at four dates, before and during the infection. As expected, the differential gene expression analysis showed that the

infection had a major impact on the transcriptome of cattle leukocytes regardless of the breeds. The functional analysis confirmed the results from the literature including an early activation of the innate immune response, followed by an activation of the humoral response and an inhibition of T cells in the chronic stage of infection. We also highlighted overlooked features, as a strong disturbance in host metabolism and cell production energy. In the trypanotolerant N'Dama breed, an early regulation of the immune response was noticed, associated with a strong activation of energy production by the cells. This latter feature was also found in Lagune. Conversely, the susceptible ZFU was characterized by a strong disturbance in lipid metabolism. Basal differences in gene expression, reflecting the structuration of cattle genetic diversity, were noticed and could have consequences on the tolerant or susceptible phenotype. Finally, the interactions between the immune response and the metabolism deserve to be deeply explored and could help understanding and counteracting the pathogenic process caused by trypanosomes in cattle.

Introduction

African animal Trypanosomosis (AAT) is a vector-borne disease that affects cattle breeding in the humid and sub-humid zones of Africa. The causal agents are extracellular blood protozoan parasites from the *Trypanosoma* genus transmitted by the tsetse fly (genus *Glossina*). *Trypanosoma congolense*, *T. vivax* and, to a lesser extent, *T. b. brucei* are the major pathogenic species affecting African livestock ((Uilenberg 1998)). The distribution of the disease corresponds to the one of the vector and spread out over 9 million km². This disease represents a serious impediment to livestock development in the endemic areas because of the high morbidity and mortality it causes ((Swallow 2000)). According to the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO, <http://www.fao.org>), it is estimated that about 50 million cattle are affected in 37 countries with an annual losses estimated at \$4.5 billion through

direct and indirect agricultural production losses ((Budd 1999), (Mattioli, Feldmann et al. 2004)). Up to now, no vaccine is available. The reduction in transmission rates is largely reliant on control of the tsetse vector and direct control in livestock is achieved with the use of trypanocides ((Bouyer, Bouyer et al. 2013), ((Meyer, Holt et al. 2016)). Above and beyond these figures, AAT is the cause of a deficit in proteins for human food, is an impediment to agricultural development, and is likely to have hindered socio-economic development to a larger extent ((Alsan 2015)).

Nevertheless, before the development of trypanocide drugs or vector-control, West African savannah and forests were inhabited by taurine breeds (*Bos taurus*), the long-horn N'Dama and several West African short-horn breeds, that possess the ability to survive and remain productive in tsetse-infested areas ((CIPEA 1979)). These West African taurine breeds (AFT) are called trypanotolerant, contrary to zebu cattle and European taurine that are susceptible to trypanosomosis and die within few weeks or months in the absence of treatment. AFT are able to control the parasitemia and limit the anemia as well as body weight loss ((Murray, Trail et al. 1984)). The trypanotolerant character, which is a remarkable example of livestock adaptation to a selective pressure caused by a pathogenic agent, has kept puzzling researchers from dozens of years. The interest of studying bovine trypanotolerance is double. From a fundamental point of view, this phenotype constitutes an intriguing model to assess the molecular bases of adaptation to a pathogen in a species that was domesticated in places where the disease did not occur ((Felix, Beerling et al. 2014), (Gautier, Flori et al. 2009)). From a practical point of view, deciphering trypanotolerance mechanisms keeps bringing the hope to develop a vaccine ((Authie, Muteti et al. 1993)) or to support genetic improvement ((d'Ieteren, Authie et al. 1998)). In addition, bovine trypanosomosis may be a model to study human sleeping sickness, caused by parasites from the same genus, since bovine are natural targets of trypanozoon (*T. brucei* group) unlike rodents.

Anyway, accurate molecular bases of trypanotolerance resists the investigation. What we currently know is that trypanotolerance is a heritable multigenic trait controlled by many loci ((Murray, Trail et al. 1990), (Trail, d'Ieteren et al. 1991), (Van der Waaij, Hanotte et al. 2003), (Hanotte, Ronin et al. 2003)). Selective sweeps analyses in trypanotolerant breeds revealed many loci or candidate genes associated with immune response, metabolism or neurology ((Gautier, Flori et al. 2009), (Dayo, Thevenon et al. 2009), (Kim, Hanotte et al. 2017)), but without the possibility to ascertain the causal selective pressure. Immunological studies rose some hypotheses, as a better specific immune response in N'Dama in comparison with Boran Zebu ((Authie, Muteti et al. 1993), (Taylor, Lutje et al. 1996)), and an earlier activation of monocytes lineage in N'Dama ((Sileghem, Flynn et al. 1993)). However, (Naessens, Leak et al. 2003) suggested that parasitemia control in trypanotolerance did not depend on the hematopoietic system, whereas anemia control did. Finally, transcriptomic studies ((O'Gorman, Park et al. 2006), (O'Gorman, Park et al. 2009)) revealed that N'Dama and Boran Zebu responded roughly identically to trypanosomes infection, but subtle differences in the response intensity or timing may occur, as higher IL6 and IL10 expression in Boran, or enhanced B cells activation in N'Dama. The last work was published in 2011 by ((Noyes, Brass et al. 2011)) on the integration of genomic and expression data and the authors proposed two candidate genes, TICAM1 and ARHGAP15, but the sequencing of these genes in several breeds did not support their roles, at least in the coding sequences ((Alvarez, Perez-Pardal et al. 2015), (Alvarez, Perez-Pardal et al. 2016)). More experiments were performed in the mouse model, in which the possibility to knockout candidate genes allows to accurately assess their contribution to tolerance or pathology ((Cnops, De Trez et al. 2015), (Magez, Radwanska et al. 2006), (Magez, Radwanska et al. 2007), (Onyilagha, Jia et al. 2015)). Nevertheless, mouse model is not the natural host of livestock trypanosomes, and important physiological features

differentiate mouse from cattle ((Taylor and Mertens 1999), (Morrison, Vezza et al. 2016)), that prevents to directly transpose results got in mouse to cattle.

In order to increase knowledge on host*parasite interactions in bovine trypanosomosis, we performed the first gene expression profiling of five cattle breeds infected by *T. congolense* using RNA-seq. Up to now, studies that investigated genetic, transcriptomic or immunological features of cattle trypanotolerance focused mainly on two breeds, the N'Dama cattle (long-horn taurine originated from Foutah-Djallon in Republic of Guinea) and the Boran Zebu (an East-African Zebu). Nevertheless, other West-African taurine cattle are trypanotolerant ((CIPEA 1979), (Akol, Authie et al. 1986), (Aboagye, Tawah et al. 1994), (Berthier, Peylhard et al. 2015)) but almost nothing is known on these breeds. We wanted to fill this gap by analyzing the transcriptome of five West-African breeds: the well-characterized trypanotolerant N'Dama breed (long-horn taurine), two overlooked trypanotolerant breeds, the Baoule and the Lagune that are short-horn taurine, one badly characterized crossbred breed, the Borgou, and one characterized trypanosusceptible breed, the Zebu Fulani. In addition, bovine transcriptional response to trypanosome infection has never been assessed using new sequencing technologies that allow studying whole-transcriptome profiling without a-priori, with the possibility to discover novel transcripts or splicing variants ((Wolf 2013), (Conesa, Madrigal et al. 2016)) and to access to parasites transcriptome ((Westermann, Forstner et al. 2016)). Lastly, we performed an in-depth functional analysis of the differential expressed genes using Ingenuity Pathways Analysis (IPA) in order to identify not only the enriched biological pathways, but also to infer their activation or inhibition state during the infection. Our experimental design was thus devoted to address the following questions: i) what are the genes that are differentially expressed in the blood of five West-African cattle breeds infected by *T. congolense*; ii) what are the associated biological pathways responding to the infection; iii) are there specific features

to each breed or to the taurine breeds; iv) are there basal or dynamic differences that could be associated with trypanotolerance?

Materials and Methods

Animals and experimental infection

The work presented here derived from an experiment on the phenotypic characterization of cattle whose material, methods and results have been previously published and described in details in (Berthier, Peylhard et al. 2015). Briefly, we performed an experimental infection with intravenous inoculation of *T. congolense* savannah type IL1180 strain on 39 cattle from five West African cattle breeds: three West African taurine (AFT), comprising the N'Dama (NDA), the Lagune (LAG), and the Baoulé (BAO), the Zebu Fulani (ZFU) and the Borgou (BOR), an admixed breed between ZFU and short-horn taurine. Intravenous inoculation of trypanosomes by needles instead of tsetse flies' inoculation was chosen in order to homogenize the quantity of inoculated trypanosomes and to avoid interactions between cattle derma and tsetse salivary antigens ((Zhao, Alves e Silva et al. 2015)). Before and during the infection, blood samples were taken at the jugular vein and the anemia (estimated by the packed cell volume - PCV-, the hemoglobin and red blood cell concentrations), the parasitemia, which are the classical variables used to assess trypanotolerance ((Murray, Trail et al. 1984), (Hanotte, Ronin et al. 2003)), and the white blood cells concentration were measured. The experiment was conducted at CIRDES, Burkina Faso, and the protocol was reviewed and approved by the Burkinabe ethical committee (Project no. A002-2013 / CE-CM). In average, parasites were first detected in the blood by microscopic observation 16 days post infection, the pic of parasitemia was reached at 25 days post-infection. Breeds did not differ neither in their prepatent period nor in the pic of parasitemia, but parasitemia lasted significantly longer in ZFU than in trypanotolerant

breeds ((Berthier, Peylhard et al. 2015)). The experiment showed that all breeds displayed anemia during the infection but LAG cattle suffered a little from anemia, while ZFU cattle were the most anemic and differed significantly from LAG animals. NDA and BAO showed similar features to LAG, while BOR had intermediate traits between AFT and ZFU. White blood cells increased highly in AFT animals, little in ZFU and BOR had an intermediate level.

RNA-seq libraries preparation

Blood samples were collected from cattle using Tempus™ Blood RNA Tubes (Applied Biosystems, USA) at four dates: before infection (named DPI.0) and during the infection, at 20, 30 and 40 DPI (Days Post-Infection), named DPI.20, DPI.30 and DPI.40 respectively. Transcriptome profiling of blood was chosen since this tissue is the place of trypanosomes multiplication and of strong interaction between trypanosomes and white blood cells. Tempus™ Blood RNA Tubes allowed blocking immediately mRNA transcription and degradation. They were stored 24h at +4°C and RNA were extracted using the Tempus™ Spin RNA Isolation Kit (Applied Biosystems, USA) according to the manufacturer instructions. RNA was finally eluted using 80 µl RNase-free buffer.

120 RNA-seq libraries were constructed at the MGX platform in Montpellier (France), which corresponded to the five breeds with six cattle per breed whose mRNA were extracted at four dates (Fig. 1). The six cattle per breed were chosen according to correct breed assignments performed on genotypes ((Berthier, Peylhard et al. 2015)) and good mRNA quality (RNA Integrity Number \geq 8.70) and quantity at the four dates of sampling. mRNA checking and library preparation (by MGX). The samples were multiplexed in 10 groups of 12 samples and assignment to the multiplexes was done first by blocking on the date and the breed, and then by random selection, in order that each multiplex contained the four dates (3 samples per date) and different breeds.

Sequencing process on HiSeq 2000 by MGX

Read's alignment to the bovine and trypanosome genomes

Raw sequencing data were saved as FASTQ files. After initial checks on sequence quality with FastQC software, reads were mapped jointly on both reference genomes of the bovine (EnsemblDB *Bos taurus* UMD 3.1 release 79) and the parasite (TritrypDB *Trypanosoma congolense* IL3000 strain release 9) using STAR aligner (STAR 2.4.0j, (Dobin, Davis et al. 2013)). For that, the mapping was performed in four steps: (i) the STAR index was generated from a unique FASTA file obtained by concatenation of the bovine and trypanosome sequences files. (ii) Reads from all libraries were aligned against the indexed reference sequences in order to identify intron-exons junctions. (iii) A new STAR index was generated from the unique FASTA file obtained by concatenation of the bovine and trypanosome sequences files and information of intron-exons junctions. (iv) A final step of reads mapping was performed on the new STAR index. A maximum of three mismatches were allowed and multi-mapping to up to 20 different positions was permitted according to the following parameters: `--alignIntronMin 50 --alignIntronMax 500000 --outFilterMultimapNmax 20 --outFilterMismatchNmax 4 --outSAMunmapped Within`. Information on reads location on both reference genomes was contained in final BAM format files. A script using Picard tools 1.130 (<https://broadinstitute.github.io/picard/>) and Samtools 1.2 (<http://samtools.sourceforge.net/>, (Li, Handsaker et al. 2009)) were used to assess the number of reads that mapped jointly to the bovine and the trypanosome genomes.

Transcripts quantification

Quantification of genes' expression was performed for each library using FeatureCounts (Subread package 1.4.6-p4, (Liao, Smyth et al. 2014)). Reads were assigned at the exon level and counts were summarized at the gene level, using default parameters (`-t exon -g gene_id`), unambiguously assign uniquely aligned single-end reads and reversely stranded reads (`-s 2`).

Gene's annotations were downloaded from Ensembl79 for the bovine (sequence UMD 3.1) and TriTryp DB 9 for *T. congolense*.

Differential expression analyses

For the subsequent analyses, we selected the counts data corresponding to the bovine genes. The differential expression analysis was carried out using the Bioconductor package EdgeR 3.18.3. under R environment ((Robinson, McCarthy et al. 2010), (Team 2008)), which models gene's count data according to a negative binomial distribution and moderates the degree of overdispersion across genes. Following the advised workflow of EdgeR, we first removed lowly expressed genes, by keeping genes that had more than one count per million in at least two libraries. On the 24,616 genes annotated in EnsemblDB 79, 13,107 genes went through the filter.

Normalization of count data was performed using the Trimmed Mean of M-values normalization (TMM) ((Robinson and Oshlack 2010)), and dispersion was estimated using a Cox-Reid profile-adjusted likelihood ((Chen, Lun et al. 2014)). A two-dimensional scatterplot was launched on the normalized count data to assess the global structuration of 120 samples ((Ritchie, Phipson et al. 2015)). It was completed by a Principal Component Analysis performed on the log of normalized count per million using mixOmics_6.3.0 ((Le Cao, Rohart et al. 2016)) with center=TRUE and scale=FALSE. A generalized linear model (GLM) was fitted for each gene, and tests for determining differential expression were done using a likelihood ratio test ((McCarthy, Chen et al. 2012)).

Nineteen contrasts were performed to assess differential expressions between two conditions using the GLM. First, we were interested to assess baseline differential expression between breeds before infection. Since the ZFU was the unique indicine breed and ZFU samples were placed on an extremity of the axis 2 in the scatterplot (see the results section), we chose to compare levels of gene expression before infection using this breed as reference. We

established four contrasts, comparing the NDA, the LAG, the BAO and the BOR breeds to the ZFU at DPI.0 (Fig 1). These between breeds' contrasts before infection were named NDA.0-ZFU.0, LAG.0- ZFU.0, BAO.0- ZFU.0 and BOR.0- ZFU.0. Second, we wanted to assess how each breed reacted to the infection. We performed 15 within breed contrasts, corresponding to three contrasts for each breed that assessed differential expression between three dates post infection and the date before infection (DPI.20 compared to DPI.0, DPI.30 compared to DPI.0 and DPI.40 compared to DPI.0, Fig 1). Contrasts were named according to breed and dates, i.e. BAO.20-0, BAO.30-0 and BAO.40-0. Because the animals had repeated samples, the design matrix was constructed according to a nested factorial formula, with animals and dates nested with the breed. GLM likelihood ratio tests provided for each contrast and each gene a logFC (log2-fold change of gene expression between conditions) and a FDR (False Discovery Rate) corresponding to adjusted *P*-values for multiple testing using the Benjamini-Hochberg procedure ((Benjamini and Hochberg 1995)). In our analyses, since 19 contrasts were done, a FDR of 10^{-3} was chosen to call a gene as differentially expressed (DE).

Functional analysis

The web-based software application Ingenuity® Pathway Analysis (IPA®, [Version 43605602, 2018-04-04, https://www.qiagenbioinformatics.com/products/ingenuity-pathway-analysis/](https://www.qiagenbioinformatics.com/products/ingenuity-pathway-analysis/)) was used to perform the functional analysis of the gene expression data, based on the manually curated content of the Ingenuity Knowledge Base (IKB) retrieved from the literature.

For all the contrasts listed above, files comprising the 13,107 analysed genes with their associated logFC, FDR and bovine Ensembl identifiers, were uploaded into the software application. A first upload was performed on 13,107 genes, and 11,316 identifiers were mapped to their corresponding object in IKB. On the 1,791 bovine identifiers not automatically annotated, we checked via Ensembl Biomart the existence of human orthologues. 577 were found to have human orthologues with a high confidence level and a match one to one. For

these genes, human Ensembl identifiers instead of bovine identifiers were used in files uploaded into IPA. At last, 11,893 Ensembl identifiers were mapped to known genes in IKB.

The functional analysis identified the biological functions and diseases (DisFun), canonical pathways (CanPath) and upstream regulatory molecules (upstream regulators, UpStream) that were the most significant in our data sets. Right-tailed Fisher's exact test was used to calculate a *P*-value determining the probability that each biological function and/or disease assigned to our data sets was due to chance alone, by comparing DE genes with a $FDR < 10^{-3}$ to the 13,107 genes in our data sets. For CanPath and DisFun, Benjamini-Hochberg corrected *P*-values, made available in IPA, were used and named B-H in the following sections. In addition, based on the logFC of the DE genes and IKB information, IPA inferred activation states by estimating Z-scores associated to the enriched functions or regulators ((Kramer, Green et al. 2014)). A Z-score ≥ 2 corresponded to an inferred significant activation or increased state, while a Z-score ≤ -2 predicted a significant inhibition or a decreasing state of a function or a regulator. IPA outputs were visualized using ggplot2 R package (<https://cran.r-project.org/web/packages/ggplot2/> (Wickham 2016)). Clustering was performed on IPA output variables using the Ward algorithm ((Murtagh and Legendre 2014)) applied to the Euclidian distance, and visualized through heatmaps using the gplots package (<https://cran.r-project.org/web/packages/gplots/index.html>).

Results

Preliminary analysis of RNA-seq data

The sequencing on an Illumina HiSeq platform of the bovine cells and trypanosomes mRNA present in the blood yielded a range of 28 to 70 million of reads for the 120 samples (S1 Table). In order to validate the joint mapping on the bovine and trypanosome genomes, we first checked the percentages of reads that mapped uniquely to the bovine or to the trypanosome

genome and reads that had multiple matches. A large majority of reads was uniquely aligned to the bovine genome (85 to 88% on the bovine genome S1 Table, from 73% to 82% for the samples sharing the index with the PhiX control). The percentage of reads aligned uniquely to the trypanosome genomes varied greatly between samples, from 4×10^{-6} to 2.27%, with a mean of 0.24% (S1 Table). Before the infection (DPI.0), few hundreds reads were assigned to the parasite genome, corresponding to a maximum ratio of 3.8×10^{-5} reads (reads uniquely assigned to the trypanosome genome/number of reads) (S2 Figure). During the infection (DPI.20, 30, 40), the number of reads assigned to the trypanosome genome increased and was closely related to the parasitemia (S2 Figure). The very low rate of sequences assigned to the parasite genome before infection was considered as negligible and as a background noise of sequencing technology and mapping algorithm (REF by MGX). We also observed at the earlier infection date (DPI.20) and at the last date of sampling (DPI.40) that some individuals had no detectable parasitemia but a high number of reads aligned to the trypanosome genome. RNA-seq was thus able to detect parasite presence whereas the parasitological method did not. The number of reads that mapped to both the bovine and the trypanosome genomes was comprised between 17 and 124, which was very low and validated the joint mapping on both genomes.

Second, we checked the presence of outlier samples. The S1 Table and the S2 Figure showed that two individuals (BO5 and Z4) did not have any significant number of sequences assigned to the trypanosome genome during the infection. A PCA performed on normalized bovine genes counts (S3 Figure) placed all the samples from BO5 and Z4 together whatever the sampling date (see below). According to RNA-seq data, infection process did not occur in these animals. Moreover, the phenotypic analysis showed that these cattle had transient parasitemia and no anemia ((Berthier, Peylhard et al. 2015)). We thus chose to discard BO5 and Z4 from further analyses. In addition, a Baoulé (BA3) was detected positive in parasitemia before the experimental infection, contrary to the others that were negative at the diagnostic tests

((Berthier, Peylhard et al. 2015)), and this animal was also discarded from subsequent analyses. The final data set contained 108 RNA-seq libraries, corresponding to 27 animals (6 NDA, 6 LAG, 5 ZFU, 5 BOR, and 5 BAO) and four dates per animal.

Global overview of gene expression

The global exploration of the expression data was done using a PCA on the log of normalized genes counts per million (Fig 2). The first two axes accounted, respectively, for 16% and 10% of the total variation. The first axis of variance explanation was associated with the infection effect. From the left to the right of Fig 2 are represented genes count data estimated before infection (DPI.0) and during the infection (DPI.20, 30, 40). The second axis was related to the breed effect: at the bottom, we found the ZFU count data, at the top, the taurine count data, represented by the NDA, the BAO and the LAG breeds and, in the middle, the admixed BOR breed data. The PCA shows that basal differences existed between ZFU and taurine breeds and breeds responded similarly to the infection since shifts from DPI.0 to DPI.40 were roughly parallel.

Differential gene expression analyses

Between breeds before the infection. At the FDR threshold of 10^{-3} , for the contrasts LAG.0-ZFU.0, NDA.0-ZFU.0, BAO.0-ZFU.0 and BOR.0-ZFU.0 respectively, 127, 152, 156, and 63 genes were called as differentially expressed. As expected according to the PCA, the number of DE genes were smaller between ZFU and BOR than between ZFU and AFT at DPI.0. Twelve genes were called DE in the four contrasts, 36 were shared between ZFU.0 versus the three AFT breeds, and 70 were shared between LAG.0-ZFU.0 and NDA.0-ZFU.0 (S4 Fig). Details on the genes, their associated FDR and logFC for the four between breeds contrasts at DPI.0 are shown in S5 Table.

Differential gene expression within-breed during the infection. At a threshold corresponding to a $FDR < 10^{-3}$, between 41 and 3839 genes were called as differentially

expressed (DE) depending on the contrast (Fig 3). The supplementary Table S6 gives detailed information on each gene related to their call as differentially expressed, their FDR and logFC, for the within-breed contrasts. As expected, the bovine transcriptome, regardless the breed, was massively modified by the trypanosome infection. The number of DE genes increased for all breeds between DPI.20-0 and DPI.30-0 (Fig 3). Then, the number of DE genes decreased slightly between DPI.30-0 and DPI.40-0 for LAG, BOR and ZFU, whereas it increased for BAO and NDA. At DPI.20-0 and DPI.30-0, the highest number of DE genes was observed in the NDA, while at DPI.30-0, LAG had little more DE genes than the NDA.

Many genes called as DE were common between two or more breeds including the trypanosusceptible ZFU (Fig 3). The number of common DE genes was always larger than the number of genes that were differentially expressed exclusively within a breed. DE genes, which were unique within a breed, were more numerous in the NDA at all dates. A global assessment of unique and shared genes between the breeds (at any dates) was performed and is displayed in S7 Figure; it highlights the complexity to investigate lists of shared genes between breeds.

We checked the direction of variation of the DE genes and observed that when a gene was given DE in several contrasts (whatever in the same breed or not), the direction of variation was identical (always up-regulated with positive logFC or always down-regulated with negative logFC). There was one exception (ENSBTAG00000014835), which was up-regulated in LAG.40-0 but down-regulated in BAO.40-0. The heatmap (Fig 4) performed on the logFC of 5,270 genes DE in at least one contrast showed that contrasts clustered first according to the time of infection, the early date (DPI.20-0) being separated from the other dates, except for the contrast BAO.30-0. At later dates, contrasts from a same breed tended to cluster together (LAG.30-0 with LAG.40-0, BOR.30-0 with BOR.40-0, ZFU.30-0 with ZFU.40-0), although NDA.40-0 and BAO.40-0 were not close to NDA.30-0 and BAO.30-0 respectively. The Fig 4 did not highlight obvious different patterns of expression between breeds.

Six genes (NR4A1, CCL22, IFI30, CTSZ, KYNU, IL17REL), all involved in the immune response, were significantly upregulated in all contrasts, meaning that they were DE within each breed for each date (S6 Table). The S8 figure displayed the relationship between the average logFC and the average $-\log_{10}(\text{FDR})$. Among genes harboring the highest average logFC, we found genes coding for hemoglobin subunits (HBM with an average logFC of 6.96, HBA, HBB) and erythrocyte proteins (GYPB, ICAM4, SOX6), for arginase (ARG1, average logFC of 6.90), and several genes involved in the immune response (MARCO, CCL2, CCL22, IL6, IL17REL, MME, MAPK12, MAPK11, MMP14) and cell function (REEP1). Genes displaying the most negative logFC were CYP17A1 (average logFC -3.08), CRTAC1, UNC5A, ACAN, ELANE, BPI, and LIF.

Crossed information between within and between breeds' contrasts. Because NDA was the breed with the highest number of DE genes during the infection, we decided to cross the data between the contrast NDA.0-ZFU.0 and the corresponding within-breed contrasts. Among DE genes at NDA.0-ZFU.0, 82 were also found DE during the infection either within the NDA or within the ZFU. A heatmap performed on the logFC estimated in the within-breed contrasts on these 82 genes shows that the first level of clustering was due to the separation between ZFU contrasts and the other breeds, and the second level separated the early infection date (DPI.20-0) from the others (Fig 5). The most up-regulated genes during the infection, highlighted in Fig 5, were MARCO (macrophage receptor with collagenous structure, significantly upregulated in all breeds except ZFU during the infection), and ENSBTAG00000022715 (unannotated gene in Ensembl). Conversely, IGF2 was downregulated in all breeds, but especially in NDA, whereas ANKEF1 was significantly downregulated in NDA only.

Functional Analysis of differentially expressed genes between breed before the infection

Due to the high number of DE genes, we decided to perform a functional analysis using Ingenuity Pathway Analysis (IPA®) in order to obtain a more synthetic and integrated interpretation of the enriched, activated or inhibited biological processes in the different contrasts. The functional analysis was first performed for the four between-breeds contrasts at DPI.0 and the threshold for considering a result as significant was a $B-H < 10^{-3}$ for the Diseases and Functions (DisFun), $B-H < 10^{-2}$ for Canonical Pathways (CanPath), and a $P\text{-value} < 10^{-4}$ for the upstream regulators (UpStream). We used different threshold between the IPA functional categories because of the difference in the quantity of information provided by these categories. Results are detailed in the S8 Table. Not any CanPath or DisFun was significant. Fifteen UpStream were considered as significantly enriched in DE genes, with 1, 0, 1, and 15 UpStream for the contrasts LAG.0-ZFU.0, NDA.0-ZFU.0, BAO.0-ZFU.0 and BOR.0-ZFU.0 respectively. Several cytokines (IL4, TNF, IFN γ) and transcription regulators (HDAC3, FOXA2, STAT3, ATF3) were enriched but only BSG was shared between three contrasts, involving LAG, BAO and BOR; the protein encoded by this gene is a plasma membrane involved in several gene ontology molecular functions: cadherin binding, carbohydrate binding, mannose binding, monocarboxylic acid transmembrane transporter activity, and protein binding. Surprisingly, the number of enriched UpStream was higher in BOR.0-ZFU.0 than in other contrasts. Results from this analysis did not bring any straightforward biological interpretation.

Functional analysis of differentially expressed genes within breeds during the infection

The 15 within-breed contrasts were then processed through IPA® functional analyses. **Diseases and functions analysis.** More than thousand biological functions were output by IPA®. At a $B-H < 10^{-3}$, 642 DisFun were significantly enriched in at least one of the 15 contrasts. Large categories regrouping the biological functions were related to cellular

development and cell cycle, hematological system development and function and immune response, cell signaling, lipid metabolism.... These categories were shared among breeds and are presented in the S9 Figure. Top diseases and functions, in term of B-H, are detailed in the S10 Table. The response was maximal for the contrasts DPI.40-0, whatever the breed, and especially for functions associated to the immune response and hematological system. Nevertheless, Lipid metabolism functions were highly significant in ZFU.20-0. Cell cycle functions (cell cycle progression, mitosis and segregation of chromosomes) were precociously enriched in NDA.20-0. Signals associated to inflammatory response were highly significant in ZFU from 30 DPI, they were also significant in BAO, BOR and LAG but not in NDA.

IPA® analyses allowed us to assess the activation state of the enriched diseases and functions through the Z-score, which may be considered significant if its absolute value is equal or larger than two. Among the 642 DisFun with a B-H $< 10^{-3}$ in at least one contrast, 201 completed this criteria. A heatmap, drawn from Z-scores, showed that the first level of clustering of the contrasts was associated with the time from infection, DPI.20-0 being separated from the other dates, and the majority of DisFun had negative Z-scores (S11 Figure), whatever the breed. We first focused on the 36 DisFun that were estimated as activated (Z-score ≥ 2), and whose Z-scores and B-H values are represented for all contrasts in the Fig 6. The main activated DisFun was linked to cholesterol, steroid, terpenoid and lipid metabolism, and were strongly enriched in ZFU.20-0, BAO.30-0 and to a less extent in NDA.20-0, BAO.40-0, BOR.20-0 and 30-0, ZFU.30-0 and 40-0. These functions were not enriched in LAG contrasts. DNA metabolism, segregation of chromosomes and cell cycle functions were especially activated in NDA, and in LAG. Glucose metabolism disorder was noticed during the infection process in BAO, ZFU and LAG.40-0. Cytopenia was inferred as highly activated in ZFU.40-0. Hypoplasia, and notably thymus hypoplasia, was activated in NDA.30-0, LAG.30-0 and

BOR.30-0. At least, quantity of class G immunoglobulins was roughly activated in all breeds from 30 or 40 DPI.

One hundred and sixty six DisFun had Z-scores smaller or equal to -2, and the Fig 7 displayed 67 DisFun with Z-score smaller or equal to -3. Down-regulated functions according to this heatmap corresponded to immunological functions: cell activation, cell movement, adhesion, chemotaxis, degranulation. T cell functions were notably down-regulated in all breeds.

Canonical Pathways. 363 canonical pathways were output by IPA® and 92 were significantly enriched with a $B-H < 10^{-2}$ in at least one contrast (S12 Table). Top enriched CanPath dealt with cholesterol biosynthesis and other pathways associated with lipids' metabolism, and they were particularly enriched in ZFU. Oxidative phosphorylation, Mitochondrial dysfunction, Sirtuin pathway and cell cycle associated pathways were highly significant in NDA contrasts, and to a less extent in LAG. Numerous pathways were linked to immune response, as Hematopoiesis of pluripotent stem cell, and T cells signaling pathways; Natural killer signaling, Atherosclerosis signaling, and Granulocyte and agranulocyte adhesion and diapedesis were significantly enriched but their activation or inhibition state could not be estimated.

Among the 92 significant CanPath, 45 had absolute Z-scores larger or equal to 2, and their B-H and Z-scores are shown in Fig 8. A first group at the bottom of Fig 8 comprised inhibited pathways, associated mainly to the immune response in late infection, at DPI.30-0 and 40-0: IL-6 Signaling, NF-kB Signaling, p38 MAPK Signaling, Th1 and Th2 pathways and LPS/IL-1 Mediated Inhibition of RXR Function; these pathways were particularly enriched in ZFU. Sirtuin Signaling Pathway was strongly inhibited in NDA. A second group at the center of Fig 8 represented highly activated metabolic pathways (cholesterol and other lipids biosynthesis, gluconeogenesis, glycolysis, TCA Cycle II, oxidative phosphorylation) in all breeds. Oxidative phosphorylation was particularly activated and enriched in NDA contrasts,

with a Z-score up to 7.5, and in LAG.30-0. At the top of Fig 8, Cell cycle associated pathways (Estrogen-mediated S-phase Entry, Cyclins and Cell Cycle Regulation, Cell Cycle Regulation by BTG Family Proteins, Mitotic Roles of Polo-Like Kinase) were enriched and activated in NDA and LAG contrasts, while G1/S checkpoint regulation was inhibited in NDA.20-0 (bottom of Fig 8). B-cell associated pathways (B Cell Receptor signaling, PI3K Signaling in B Lymphocytes) were activated in BAO, BOR, LAG and ZFU. Lastly, Inflammasome pathway was enriched in ZFU.30-0 and ZFU.40-0 and was estimated as strongly inhibited in this last contrast.

Upstream Regulators. 2,582 UpStream (proteins or endogenous chemicals) were output by IPA®. 316 Upstream regulators, shown in S13 Table, were considered as significantly enriched in at least one contrast ($P\text{-value} < 10^{-4}$). Upstream regulators found significant in almost all contrasts at the chosen threshold were: TGFB1 (14/15 contrasts), TNF (13/15 contrasts), CSF2, Vegf (12/15 contrasts), TCF3, IL4, PTEN (11/15 contrasts). 95 upstream regulators belonged to the transcription regulator category, 29 were endogenous chemical and 26 were cytokines according to IPA® classification. A group of upstream regulators, comprising PPARA, SCAP, POR, SREBF1 and SREBF2, INSIG1, cholesterol was particularly significantly enriched in ZFU.20-0. On the other side, PTGER2, CSF2, E2F1, HGF, TCF3, RB1 was highly significant in NDA contrasts, and to a lesser extent in LAG.30-0, BOR.20-0 and then other contrasts. In order to visualize the main activated or inhibited regulators, the Fig 9 presents the estimated Z-score of 88 upstream regulators with significant P-values smaller than 10^{-6} and absolute Z-score equal to or larger than 2 in at least one contrast. Some UpStream were highly activated during the infection process (at the top of the Fig 9), as MYC, INSR, CSF2, HGF, Vegf, PTGER2, SCAP, SREBF1 and SREBF2. Others were strongly inhibited during the infection, as RICTOR, POR, KDM5A, BNIPL3, CDKN2A, cholesterol, INSIG1. The cytokine's group showed differentiated patterns: IL2 and IL7 were rather assessed as inhibited from DPI.30 or 40, while

IL4 and IL15 was rather activated in NDA.20-0 and BOR.30-0, and a temporal dynamic was observed for IL5, IL1B, TGFB1 and TNF that tended to be activated in the early infection process (DPI.20-0) and inhibited in the chronic state (DPI.40-0). INFG was strongly enriched (see S13 Table) but its Z-score, while globally positive, remained below 2. Some upstream regulators showed the same trends in term of activation or inhibition among breeds, but with various intensities. Hence, HGF, MYC, INSR, CSF2, HGF, PTGER2, were more strongly activated in NDA than in other breeds, while RICTOR, KDM5A, CDKN2A, Rb complex, Irgm1, BNIP3L were more strongly inhibited in NDA. SMOC2 was enriched and activated only in NDA and LAG.30-0. TBX21 was particularly activated in LAG (P=10⁻⁷, Z-score=2.5 LAG.40-0). POR and cholesterol were highly enriched and inhibited in ZFU, while 10E, 12Z-octadecadienoic acid, DBI and STAT6 was activated in ZFU.20-0 and DBI remained highly enriched and activated in ZFU only. IL10 was inhibited in ZFU.30-0.

Functional Analysis of differentially expressed genes uniquely within a breed

In order to assess the specificity of each breed, we performed an enrichment analysis with IPA on the genes differentially expressed uniquely within a breed, i.e. the genes corresponding to the blue part in the Fig 3. Significant DisFun (Mitochondrial Disorder and Mitochondrial respiratory chain deficiency, BH=10⁻⁵ and 10⁻⁴ at DPI.30-0 respectively) and CanPath (Oxidative Phosphorylation, BH=10⁻⁷ and Z-score=4, and Mitochondrial Dysfunction, BH=10⁻⁶) were found in NDA only, at 30-0 and 40-0 DPI. Several UpStream were found significantly enriched: RICTOR (Z-score=-4.8), RB1 (Z-score=2) and KDM5A (Z-score=-3.5) in NDA.30-0 and 40-0, LRP1 in BAO.40-0, and sterol, INSIG1, cholesterol (Z-score=-2.6), SCAP (Z-score=2.2) and SREBF1 (Z-score=2.4) in ZFU.30-0. Functional analysis of unique regulated genes supported thus specificities highlighted in the general analysis above.

Crossed-analysis of between-breeds and within-breed contrasts

We wondered if genes that were differentially expressed between breeds before the infection ('between-breeds' contrasts) could be involved in biological functions that were regulated during the infection. We chose to search the genes that were D.E in the contrast NDA.0-ZFU.0 and that could be involved in significant functions highlighted in the 15 within-breed contrasts studied above (S14 Table). On the one hand, 13 CanPath were concerned, among which Oxidative phosphorylation, Mitochondrial dysfunction, Sirtuin pathway, and Th1 and Th2 pathways. 351 DisFun contained genes DE in ZFU.0-NDA.0, top functions in term of number of genes were associated to Cancer, Cell Death and Survival, Cell movement, Cell-to-cell signaling and interaction, Hematological Disease, Inflammatory Response etc... At least, 105 upstream regulators could influence the expression of genes among which some were D.E. between ZFU and NDA before infection. Top enriched upstream regulators were cytokines (i.e. INFG, IL2, TNF, CSF2, IL4), growth factors (TGFB1, HGF), TP53, Vegf, MYC... On the other hand, 55 D.E. genes in ZFU.0-NDA.0 were involved in functions significantly enriched during the infection and, among them, 25 were present in at least ten functions. Top genes were IL2RA, which was involved in 276 functions, IGF2 in 142, GATA1 in 95, GPB2 in 52, MARCO in 58 functions.

Discussion

Though bovine trypanotolerance has been described from more than a century ((Pierre 1906)), the biological bases of this phenotype remain poorly understood. This is due to the trait complexity, that is multigenic and emerged from host*parasite interactions, but also to the difficulty to work on cattle, in comparison to model species ((Morrison, Vezza et al. 2016)). In order to increase the knowledge on physio-pathology of *T. congolense* infection in cattle, and to potentially identify new clues in trypanotolerance, our study provides the first transcriptome

profiling of whole blood of five bovine breeds during a trypanosome infection using RNA-seq, added by a deep functional analysis. Our results confirmed some previous observations. As highlighted by (O'Gorman, Park et al. 2009), cattle blood transcriptome was strongly disturbed by *T. congolense*, numerous differentially expressed genes and regulated biological functions were shared between breeds, and the N'Dama breed seemed to respond earlier to the infection than the other breeds. We confirmed that immune system functions were strongly regulated, and if pathways or functions associated to humoral response were activated, cellular responses linked to T cells tended to be inhibited, which supported previous studies in cattle ((Taylor and Mertens 1999)) or mice where T cells functions impairment was noticed ((Tabel, Wei et al. 2008), (Stijlemans, Radwanska et al. 2017)). However, we highlighted overlooked features: numerous genes and functions modified by the infection were involved in host metabolism, which is susceptible to play an important role in the pathology. In addition, it may be suspected that basal differences in the regulation of some genes between breeds before infection could be involved in trypanotolerance.

Massive modification of the cattle transcriptome during *T. congolense* infection, whatever the breed

The PCA performed on normalized gene counts demonstrated that the trypanosome infection had a major impact on cattle transcriptome, and that the breeds exhibited a parallel shift in their gene expression profiling. This observation and the fact that many DE genes were shared among breeds and varied in the same direction showed that whole blood transcriptome varied roughly in the same way whatever the breed. Nevertheless, the NDA breed showed the highest number of D.E. genes, with an earlier transcriptome modification. This is in agreement with the results from (O'Gorman, Park et al. 2009), who noticed a higher number of DE genes in NDA in comparison with the Boran Zebu, in an experiment based on genes expression

estimated by microarray in PBMC. In addition, we assessed the robustness of our results by comparing them to those obtained by ((O'Gorman, Park et al. 2006)) and ((O'Gorman, Park et al. 2009)). When genes were significantly DE in (O'Gorman, Park et al. 2006) or (O'Gorman, Park et al. 2009) and in our experiment, gene expression varied in the same direction, whereas the experiments were done in different breeds, on different tissues (whole blood in the present study versus PBMC in (O'Gorman, Park et al. 2006) and (O'Gorman, Park et al. 2009)), and with different techniques (qPCR in (O'Gorman, Park et al. 2006), microarray and qPCR in (O'Gorman, Park et al. 2009)). In (O'Gorman, Park et al. 2006) and in our data, IL6 and NFKB1 were clearly upregulated, while IL1RN was strongly downregulated in all breeds (except BOR) and IL8 was significantly downregulated in NDA.40-0. IL10 expression exhibited a high increase in the Boran Zebu, especially at 20 DPI, in (O'Gorman, Park et al. 2006), and, alike, IL10 was significantly upregulated in ZFU (20-0 and 30-0), but also in LAG and BAO at 30-0 in our data set, but not in NDA neither in BOR. Of nine upregulated genes selected by (O'Gorman, Park et al. 2009), eight were also significantly upregulated in our data set, CD19 for instance exhibiting the same sustainable increase in expression in all breeds. Of 14 downregulated genes in (O'Gorman, Park et al. 2009), eight were significantly downregulated, four being not significant in our data set and two genes were not annotated in Ensembl. Even if some variability exists (within breed, between breeds and between experiments), the global response to *T. congolense* infection in cattle seems robust.

In our study, the six genes found significantly upregulated in the 15 within-breeds contrasts are all involved in the immune response. NR4A1 is a nuclear receptor involved in the modulation of inflammation: it was highly expressed in resident macrophages responsible for the phagocytosis of apoptotic cells, and was involved in maintenance of self-tolerance to dying cells ((Ipseiz, Uderhardt et al. 2014)). It was shown to have an inhibitory role in Th1 and Th17 cells differentiation ((Wang, Zhang et al. 2018)), and to limit expansion and effector of CD8+

T cells ((Nowyhed, Huynh et al. 2015)). Interestingly, NR4A1^{-/-} mice infected by *T. congolense* displayed an increased TNF production and liver damage in comparison to wild-type mice ((Morias, Abels et al. 2015)). According to these authors, NR4A1 could have a protective role by modulating the inflammation. CCL22 was estimated as highly expressed in Dendritic Cells (DCs) ((Vulcano, Albanesi et al. 2001)). It was shown to recruit regulatory T cells (Treg) and iNKT cells, activate Treg, inhibit proliferation and effector functions of CD4 and CD8 T cells, and finally to contribute to reduce the immune destruction in autoimmune diabetes in NOD mice ((Bischoff, Alvarez et al. 2015)). It contributes to immune homeostasis during apoptotic cells clearance by some DCs through Tregs recruitment ((Hao, Han et al. 2016)). IFI30 is the only known lysosomal thiol reductase, and it is constitutively expressed in antigen-presenting cells, and induced by INF γ in other cell types ((Arunachalam, Phan et al. 2000)). Its first role is in MHC II and MHC I antigen presentation ((West and Cresswell 2013)). CTSZ protein was found in macrophages and DCs ((Kos, Sekirnik et al. 2005)) and it is thought to be crucial for the regulation of DCs maturation ((Obermajer, Svajger et al. 2008)). KYNU, which codes an enzyme involved in tryptophan metabolites degradation, is expressed by myeloid cells subset (DCs, mono, macro), and also other cells (endothelial, keratinocytes). Its expression was associated to psoriasis and inflammation in human, with tryptophan metabolites downstream KYNU upregulating pro-inflammatory genes ((Harden, Lewis et al. 2016)). The last one is IL17REL, for which few information is available but variants in this gene were associated to inflammatory diseases in human (Franke, Balschun et al. 2010)). (Mou, Jia et al. 2010) suggested a protective role of IL17 in the mouse model, and an upregulation of IL17REL in our data set could be relevant. Finally, according to the literature, these genes are especially expressed by the myeloid cells (except for IL17REL).

Among genes with the highest logFC were found three genes coding for hemoglobin subunits (HBM, average logFC 6.96, HBA 4.10, HBB 3.32), two genes coding for erythrocyte

surface antigens (GYPB and ICAM4), and SOX6, a gene associated with erythropoiesis. HBM was significantly upregulated in all breeds, while other genes were not constantly significantly upregulated. Nevertheless, this demonstrated that cattle responded quickly to cope with the anemia induced by the trypanosomes and exhibited an increased export of reticulocytes from the bone marrow to the blood. Noting that very low level of hemoglobin subunits is normally found in the blood of healthy cattle, contrary to human or pig ((Correia, McLoughlin et al. 2018)). Another gene with a very high logFC (average 6.90) was ARG1, which codes for Arginase 1. Interestingly, arginase activity was shown to be induced in macrophages from mice infected by *T. brucei* ((Gobert, Daulouede et al. 2000)) or *T. congolense* ((Noel, Hassanzadeh et al. 2002)) and its increase was higher in susceptible BALBc mice than in tolerant C57Bl/6 mice ((Duleu, Vincendeau et al. 2004)), while (Kierstein, Noyes et al. 2006) found a higher expression in C57Bl/6 than A/J mice. ARG1 has an important role in the balance of the immune response and it was associated in mice with an anti-inflammatory response and M2 macrophages, opposed to M1 macrophages producing NO (Nitric Oxyde) ((Mills, Kincaid et al. 2000)). Recently, experiments in mice infected by *T. congolense* tended to show that suppression of CD4⁺ T cell was mediated by arginase-1 activity in myeloid-derived suppressor cells ((Onyilagha, Kuriakose et al. 2018)). But, in addition to its role in the immune response, arginase-1 activity promotes the production of polyamines which favors trypanosomes growth ((Fairlamb and Cerami 1992)) and (De Muylder, Daulouede et al. 2013). In our data set, ARG1 was found highly expressed during the infection, similarly as what is found in mice, but with no straightforward differences between breeds.

Other top up-regulated genes were related to the immune response: IL6 (significant in at least a time-point in all breeds except BAO), MME, MAPK12 and MMP14 (significant in at least a time-point in all breeds), CCL2 (upregulated but significant in LAG and BOR only), and MARCO and CSTB (significantly upregulated in all breeds except in ZFU). As described

above, IL6 gene expression was found upregulated in NDA and Boran Zebu ((O'Gorman, Park et al. 2006)). In addition, in human African trypanosomiasis (HAT) due to *T. brucei gambiense*, IL6 plasmatic protein concentration was significantly higher in seropositive asymptomatic people in comparison to healthy or HAT patients ((Ilboudo, Bras-Goncalves et al. 2014)) and IL6 SNP was associated to a decreasing risk of developing the disease ((Courtin, Milet et al. 2006)). IL6 is mainly considered as a pro-inflammatory cytokine involved in immune cells recruitment and B and T cell differentiation ((Tanaka, Narazaki et al. 2014)), but it may also have anti-inflammatory properties, and its function may depend on the receptors with which IL6 interacts ((Scheller, Chalaris et al. 2011)) or the cytokine environment ((Casella, Garzetti et al. 2016)). IL6 was thus associated to both M1 and M2 macrophages ((Arango Duque and Descoteaux 2014)). In our data set, while IL6 was upregulated, IL6R and IL6ST were downregulated. Combining our data set and the bibliography, IL6 is surely an important cytokine expressed in mammals during a trypanosome infection. MAPK12 (named also p38g) belongs to the p38MAPK pathway, involved in the transduction signal from membrane receptor to cytokine transcription. It was shown to be activated in murine myeloid cell lines in response to LPS, and acted to control cytokine expression (TNFa, IL1b, IL10, and IL12) ((Risco, del Fresno et al. 2012)). MMP14 codes for a membrane-bound protease with pleiotropic effects but (Aguirre, Blazquez-Prieto et al. 2017) showed that knock-out mice for this gene showed higher mortality linked to sepsis under LPS administration, and this gene improved inflammation control. CCL2 (significant in LAG and BOR) is an important chemokine produced by a variety of cell types, the major sources being monocytes and macrophages. It regulates the migration and infiltration of monocytes, T and NK cells ((Deshmane, Kremlev et al. 2009)). CCL2 was found to increase in the liver of C57Bl6 mice infected by *T. brucei*, and to be involved in the recruitment of monocytes that differentiated into pro-inflammatory and pathogenic DCs ((Bosschaerts, Guilliams et al. 2010)). However, its pro- or anti-inflammatory action may

depend on the receptors with which the chemokine interacts ((Deshmane, Kremlev et al. 2009)). Unlike previous genes especially expressed by myeloid cells, MME (CD10) is an endopeptidase found mainly in immature human B lymphoid cells ((Loken, Shah et al. 1987), (Mishra, Singh et al. 2016)). At last, two top upregulated genes were significant in all breeds except in ZFU: MARCO (which was also differentially expressed before infection between ZFU and AFT) and CSTB (with a high variability in expression dynamic among ZFU animals). MARCO is a pattern recognition receptor present on macrophages surface and involved in the phagocytosis of various pathogens and the subsequent enhancement of the immune response ((Arredouani, Yang et al. 2004), (Bowdish, Sakamoto et al. 2009)). (Thuong, Tram et al. 2016) suggested that genotypes of MARCO are associated to a reduced phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* ligands in human. CSTB, a endogenous cystatin, was shown to be localized in the cytosol and nucleus in mouse macrophages, and its expression increased in macrophages stimulated by LPS and IFN γ but it seemed involved in inflammation control, notably by preventing an excessive superoxide generation in the mitochondria ((Maher, Jeric Kokelj et al. 2014)).

Top regulated genes appeared thus to be mainly associated to erythropoiesis and to immune response enhanced by myeloid cells (monocytes, macrophages and DCs), comporting both pro-inflammatory and anti-inflammatory aspects. A top gene was also associated to B cells.

Conversely, top downregulated genes appeared associated to other cells lines. ELANE (a serine protease) and BPI (a lipid-transfer protein) are expressed mainly by neutrophils and participate in antimicrobial defense, ELANE being also involved in inflammation ((Nayak, Trump et al. 2015)) and BPI being especially active against gram-negative bacteria ((Schultz and Weiss 2007)). MSA42 (a subunit receptor for IgE) and CMA1 (a chymotryptic serine protease) are expressed in mast cells with different functions, the former would act as a net amplifier of effector cell responses ((Dombrowicz, Lin et al. 1998)) while the latter may

degrade some virulence factor or regulate inflammation ((Roy, Ganesh et al. 2014)). CYP17A1 (a member of the cytochrome P450 superfamily) was downregulated in NDA and LAG. The encoded protein is involved in the steroidogenic pathway that produce mineralocorticoid, glucocorticoid and androgens ((Van Den Akker, Koper et al. 2002)). UNC5A was downregulated in all breeds. The encoded protein is mainly known as an axon-guidance protein, but it is also expressed on CD4⁺ T cells, where it may interact with other receptors to modulate chemokinesis ((Boneschansker, Nakayama et al. 2016)) and it is a transcription target of p53 to induce apoptosis ((Miyamoto, Futamura et al. 2010)). RNASE1 is expressed by endothelial cells and would participate in vascular homeostasis and was shown to be down-regulated by TNFa ((Gansler, Preissner et al. 2014)). Several downregulated genes encode extracellular matrix proteins, CSPG4 (a proteoglycan involved in cell proliferation and migration), CRTAC1 and ACAN (not significant in ZFU, roles emphasized in cartilage), which were not highlighted up to now in host*pathogen interactions. IGFBP1 (an Insulin-like Growth Factor Binding Protein) has pleiotropic roles in cell motility and adhesion, apoptosis and cell cycle ((Firth and Baxter 2002)). At last, two genes, DAB2 and LIF, seems to be the counterpart of up-regulated genes. First, DAB2 (a Clathrin Adaptor Protein) has pleiotropic functions but, in DCs and macrophages, it would act as an intrinsic negative regulator of immune function and inflammation ((Ahmed, Byeon et al. 2015), (Hung, Ling et al. 2016)): its downregulation in our data set could thus allow a better activation of DCs and macrophages. LIF (Leukemia Inhibitory Factor) is a pleiotropic cytokine expressed by T cells, especially CD4⁺ in human and regulatory T cells in mice, which is known to be opposite to IL6 ((Metcalf 2011)). Interestingly, in our data set, LIF was downregulated while IL6 was upregulated. (Ullah, Tripathi et al. 2012) demonstrated that LIF negatively regulates Th2 differentiation, and this cytokine prevents differentiation towards immune aggressive cells.

Functions, upstream regulators and canonical pathways highlighted during the infection process: focus on the immune response

Observations of the genes called differentially expressed during the infection brought relevant information on biological processes interacting with the trypanosome infection, but the huge quantity of DE genes, and the fact complex molecular network and cellular pathways may be involved in the response to the infection, make it necessary to enrich DE genes with prior knowledge to identify functional processes. We used IPA software that allows not only to search for significant functions, pathways or upstream regulators, but also to infer the direction of regulatory effects, and the potential upstream or downstream effects ((Kramer, Green et al. 2014)). In addition, upstream regulators, which cannot be directly measured in RNA-seq data because they may be expressed in another tissue than the one which is sampled, or at another time than the sampling date, or because they are simply not a gene (i.e. a biochemical compound), may be identified.

As expected, DisFun associated with hematological system development and function and the immune response were particularly enriched in the cattle blood transcriptome during the trypanosome infection. But the striking feature is that groups of functions related to cellular functions (homeostasis of blood cells, lymphocyte homeostasis, T cell development, cell movement of lymphatic system cells...) were inferred as inhibited in all breeds at DPI.30-0 and DPI.40-0, as well as canonical pathways linked to T cells functions (Th1 and Th2 pathways, iCOS-iCOSL Signaling in T Helper Cells), and pleiotropic pathways (NF-kB Signaling and p38 MAPK Signaling). On the contrary, functions and pathways associated with humoral response were activated, as quantity of Ig, B Cell Receptor Signaling, PI3K Signaling in B Lymphocytes. These results are consistent with information got previously in cattle and in other species. B cell activation, expansion and antibodies production were reported in cattle by ((Pinder, Bauer et al. 1988), (Naessens and Williams 1992), (Taylor, Lutje et al. 1996), (O'Gorman, Park et al.

2009)) but also in human ((Boda, Courtioux et al. 2009), (Lejon, Mumba Ngoyi et al. 2014)) and in mouse ((Onyilagha, Jia et al. 2015)). Antibodies response, especially IgG production, appears to be essential for parasite killing in cattle ((Taylor 1998)) and mice ((Magez, Radwanska et al. 2006)). Besides, several genes involved in macrophages pathway associated with Ig crosstalk were upregulated in our data set (FCGR1A, FCGR2B, FCGRT, SYK, PI3K, KRAS, (Martinez and Gordon 2014)).

An impairment of T cell functions was observed in infected cattle, with a decrease in proliferative response to Concanavalin A in cells collected from lymph nodes ((Flynn and Sileghem 1991), an abrogation of IL2 secretion and an impairment of IL2Ra ((Sileghem and Flynn 1992)). *Ex vivo* lymphoproliferative response was nevertheless observed using some trypanosome antigens ((Lutje, Mertens et al. 1995), (Lutje, Taylor et al. 1996)) and an important variability between these experiments was noteworthy and seems to be linked to experimental conditions (tissue and date of sampling, antigens used for lymphoproliferation, inter-individual variability). In our study, several genes expressed by T cells were downregulated (CD3d, CD3e, CD3g, CD4, CD8a, CD8b, CD27, IL2Ra (=CD25), ZAP70). IL2, as an upstream regulator in IPA, was significantly inhibited from DPI.30 in NDA, ZFU and LAG, and from DPI.40 in BAO and BOR (i.e. Z-score=-3.4 and P-value= 10^{-7} in NDA.40-0). IL2 was assessed as downregulated in PBMC from infected NDA and Boran Zebu ((O'Gorman, Park et al. 2006)). A T cell dysfunction was also suggested in HAT ((Boda, Courtioux et al. 2009)) and was reported in mouse ((Uzonna, Kaushik et al. 1998)). These results suggest that T cells are not involved in bovine trypanotolerance, but this does not ruled out a contribution to the pathology in general. Surprisingly, CD3 as an upstream regulator was inferred as activated at DPI.20-0 by IPA, and TCR was inferred as activated and then inhibited. These results would suggest an early activation of T cells by APC. Interestingly, some CD3 genes expression may be negatively regulated in case of T cells activation by APC or other stimulus ((Paillard, Sterkers et al. 1990),

(Badran, Kunstman et al. 2005), (Krishnan, Warke et al. 2001)). (Paillard, Sterkers et al. 1990) interpreted this observation as a negative feed-back system necessary to control T cell activation, and (Krishnan, Warke et al. 2001) suggested that T cells exhibiting a reduction of CD3z expression could correspond to effector T cells generated under a chronic activation. In the case of infection by trypanosomes, which are able of long-term survival in the vertebrate host thanks to antigenic variation ((Jackson, Berry et al. 2012), (Matthews, McCulloch et al. 2015)), a reduced expression of TCR and CD3 genes could constitute a protective way to avoid over-activation of T cells.

In our data set, the Natural Killer Cell Signaling, previously highlighted by (Noyes, Brass et al. 2011), was significantly enriched, especially in BAO.40-0. However, no inference on the activation or inhibition state could be performed, since some genes of the pathway were upregulated (as VAV1, VAV2) and others were inhibited (NCR1, NCR2, CD247, TYROBP). Likewise, granulocytes and agranulocytes adhesion and diapedesis and atherosclerosis signaling were significantly enriched, but without inference on activation or inhibition state. Modulation of pathways involving endothelial cells during the infection is not surprising since *T. congolense* adheres to endothelial cells ((Hemphill and Ross 1995)).

In the mouse model, a longer lifespan is hypothesized to result from an efficient switch from an early pro-inflammatory response, based on classically activated macrophages, named also M1 macrophages (associated with INFg, TNF, Nitric Oxyde (NO) production), to an anti-inflammatory response, based on alternative activated or M2 macrophages (associated with IL10, IL4, IL13, ARG1) ((Baetselier, Namangala et al. 2001)). An insufficient or a prolonged inflammatory response was associated to death during *T. congolense* infection, as C57Bl/6 mice knock-out for several genes (INFgR, iNOS, TNF) had shorter lifespan and higher parasitemia than wild-type mice ((Magez, Radwanska et al. 2006), (Magez, Radwanska et al. 2007)), whereas sustained pro-inflammatory macrophages increased liver damage ((Morias, Abels et

al. 2015), (Stijlemans, Leng et al. 2014)). A question deals with the involvement of such a switch from M1 to M2 macrophages in cattle. First, iNOS and NO production were not found activated in cattle trypanosomosis, neither in susceptible Boran ((Taylor, Lutje et al. 1996)) nor in tolerant N'Dama ((Taylor, Mertens et al. 1998)), and iNOS (syn NOS2) was not differentially regulated in our data set (S Table 6). However, as described above, top upregulated genes belonged to immune response and were more particularly associated with monocytes, macrophages and dendritic cells. Our data set showed that genes associated with both M1 and M2 macrophages were regulated at the same time, and it is noteworthy that several subtypes of M2 macrophages (M2a, M2b, M2c) were described in the mouse ((Arango Duque and Descoteaux 2014)). Among upregulated genes we found IL6, associated to both M1 and M2 in the mouse, IL10 (M2), CCL22 (M2a), ARG1 (M2a, M2c), CD40 (M1, M2), CFB (M1), MARCO (M1), PTGS2 (M1), CD83 (M2), MYC(M2) ((Arango Duque and Descoteaux 2014), (Jablonski, Amici et al. 2015)), while IL16, SLC40A1 and NR1D2 expression decreased in our data set and were reported to decrease in activated macrophages ((Jablonski, Amici et al. 2015)). IL1B, a proinflammatory cytokine, was downregulated at the chronic stage, 30 DPI (ZFU.30-0) and 40 DPI (NDA.40-0 and BAO.40-0). It seems thus that several genes associated to M2 macrophages were upregulated, especially ARG1, but genes associated to M1 were also upregulated. This highlights the complexity of the immune response regulation in vivo, but also the fact that several macrophages population may coexist, are plastic and produce mixed phenotypes ((Murray and Wynn 2011), (Martinez and Gordon 2014)). In addition, the complexity of genes regulation is illustrated by the p38MAPK complex, which comprised four kinases involved in stress response and especially cytokine production in myeloid cells ((Risco, del Fresno et al. 2012), (Cuenda and Sanz-Ezquerro 2017)). In our data set, MAPK11 and MAPK13 were significantly upregulated while MAPK12 and MAPK14 were downregulated.

Nevertheless, the functional analysis allowed highlighting a temporal dynamic that emerged from the cattle immune response. In fact, several major upstream regulators, and especially cytokines like TNF, IL2, IL5, TGFB1, were inferred as rather activated at DPI.20-0 and then inhibited at DPI.40-0. Interestingly, TCR (T Cell receptor complex) was inferred as activated in ZFU.20-0 (Z-score=2.61, P-value=0.001) and NDA.20-0 (Z-score=1.97, P-value= 2×10^{-4}), but its Z-score decreased afterwards and became rather negative in NDA.40-0 (Z-score=-1.69, P-value= 10^{-9}). These results tended to support the switch hypothesis made in the mouse model, with an activation of the inflammatory response, exemplified by TNF dynamic, followed by a trend towards an anti-inflammatory response. Whether this dynamic is due to an immunosuppression provoked by the trypanosome, or a component of the host*parasite equilibrium ((Taylor 1998)) to avoid a deleterious sustained inflammatory response cannot be answered. IFNg was also particularly enriched (*P-value* between 10^{-3} (BAO.20-0) and 10^{-15} (ZFU.40-0)) which suggested that this cytokine was important during the infection, as in the mouse. Its activation state was rather positive (Z-score between -0.37 (ZFU.40-0) and 1.98 (LAG.30-0)) but did not reach the threshold of |2|, that allowed to clearly interpret its activation state.

Functions, upstream regulators and canonical pathways highlighted during the infection process: focus on the metabolism

In addition to genes and biological functions associated to the immune response, the striking feature of our results is the enrichment of biological processes linked to metabolism regulation. Top enriched and activated functions were metabolism of cholesterol and steroid and glucose metabolism disorder. The biosynthesis of sterols and cholesterol were among the canonical pathways identified as highly activated, as well as gluconeogenesis. The activation of these functions and pathways suggested an increased lipid and glucose production by host's cells. Numerous upstream regulators were also associated to metabolism; some were estimated

as activated (INSR, SREBF1, SREB2, SCAP) and others as inhibited (HDL-cholesterol, CYP51A1, POR, INSIG1, INSIG2). This suggested a strong impact of trypanosome infection on metabolism, which is supported by the literature. In fact, a decrease in plasma lipids concentrations has been observed in cattle infected by *T. congolense* ((Traore-Leroux, Fumoux et al. 1987)) or *T. vivax* ((Dagnachew, Terefe et al. 2014)), in goats infection by *T. congolense* ((Ndoutamia, Mbakasse et al. 2002)) and in pigs infected by *T. brucei* ((Adamu, Barde et al. 2009)). In addition, a cholesterol metabolic pathway was disturbed in mice infected by *T. congolense* ((Kierstein, Noyes et al. 2006)) or a *T. brucei* strain ((Morrison, McLellan et al. 2010)). The lowering of lipids and cholesterol observed in the serum of mammals could, partly, be the result of internalizing and utilization of the molecules by the parasites ((Traore-Leroux, Fumoux et al. 1987), (Green, Del Pilar Molina Portela et al. 2003)). In our results, canonical pathways and functions linked to host cholesterol production were inferred as activated, while the cholesterol, as an upstream regulator, was estimated as inhibited, suggesting a cholesterol consumption by the trypanosomes. The hypocholesterolemia observed during trypanosomosis is expected to have deleterious effects on the host, by compromising normal cellular and physiological functions (Wang, Rogers et al. 2008), damaging the integrity of the erythrocyte plasma membranes and contributing to anemia ((Traore-Leroux, Fumoux et al. 1987)). Moreover, cholesterol metabolism is strongly implied in the immune response ((Kay, Murray et al. 2006)). For instance, the LXR/RXR Activation pathway, enriched in ZFU (and activated at ZFU.40-0) and BAO.30-0, is involved in lipid metabolism (lipogenesis, cholesterol metabolism, cholesterol efflux) but also in innate immunity in macrophages ((Joseph, Bradley et al. 2004), (Ahsan, Maertzdorf et al. 2018)).

The gluconeogenesis canonical pathway was also strongly activated in our data set. An increased production of glucose by the host could be a response to glucose consumption by the trypanosomes ((York, Adams et al. 1929)), as hypoglycemia was observed in infected cattle

((Dagnachew, Terefe et al. 2014)), goats ((Ndoutamia, Mbakasse et al. 2002)) and a dog ((Deschamps, Desquesnes et al. 2016)), but also to the energetic needs of immune cells. Indeed, glycolysis and oxidative phosphorylation were activated in all breeds. Rate of glycolysis in macrophages is known to increase during phagocytosis and secretory activity ((Newsholme, Curi et al. 1986)) or in pro-inflammatory (M1) macrophages activated by LPS ((Mills, Kelly et al. 2016)) or in activated DCs or Th17 cells ((McGettrick and O'Neill 2013)), while oxidative phosphorylation is rather associated with anti-inflammatory (M2) macrophages or Tregs ((McGettrick and O'Neill 2013), (Mills, Kelly et al. 2016)). Activated B cells seem able to increase both glycolysis and oxidative phosphorylation ((Caro-Maldonado, Wang et al. 2014)). The fact that the two pathways of energy production were inferred as activated corroborates the presence of diverse immune cells populations and/or B cells activation. In addition, (McGettrick, Corcoran et al. 2016) demonstrated that a metabolite of *T. brucei* was able to interfere with the induction of glycolysis in mice macrophages and inhibited IL1B secretion. In our data set, IL1B gene was significantly downregulated, but glycolysis seemed nevertheless activated.

Breed's features

The global analysis of genes expression and their associated biological functions demonstrated that cattle, whatever the breed and its trypanotolerant status, responded roughly similarly to the infection, as already observed ((O'Gorman, Park et al. 2006), (O'Gorman, Park et al. 2009), (Noyes, Brass et al. 2011)). Nevertheless, a focus on each breed allows observing some differences in their transcriptome, the enrichment and the intensity of activation or inhibition of some biological functions.

As already observed by (O'Gorman, Park et al. 2009), the N'Dama blood transcriptome seemed to response earlier and more intensely to the infection, with a higher number of DE genes in this breed during the infection in comparison to the other breeds, except at DPI.30-0

when LAG.30-0 had a little more DE genes. At DPI.20-0 and DPI.30-0, biological processes related to cell cycle and DNA metabolism (i.e. in diseases and function: segregation of chromosomes with a $P\text{-value}=10^{-15}$ and $Z\text{-score}=2.0$; metabolism of DNA, $P\text{-value}=10^{-7}$, $Z\text{-score}=3.7$; in canonical pathways cyclins and cell cycle regulation, $P\text{-value}=10^{-6}$, $Z\text{-score}=2.4$; in upstream regulators: E2F1, $P\text{-value}=10^{-18}$, $Z\text{-score}=4.2$) were strongly enriched and activated in NDA, and explained the enrichment of cancerous diseases functions by IPA (i.e. Female genital tract cancer, $P\text{-value}=10^{-12}$) due to pleiotropy. The fact that lymphopoiesis function was simultaneously assessed as strongly inhibited ($P\text{-value}=4*10^{-9}$, $B\text{-H}=10^{-5}$, $Z\text{-score}=-3.6$ at DPI.30-0) could seem paradoxical, but lymphopoiesis included especially downregulated genes corresponding to immune cells, and notably T cells receptors and signal transducers, while segregation of chromosomes included genes involved in mitosis and centromeres formation. These results suggested an early activation of division and proliferation of some cells type in NDA, whereas T cells proliferation seemed inhibited from DPI.30-0, as in all breeds.

Oxidative phosphorylation ($B\text{-H}=10^{-12}$, $Z\text{-score}=7.1$ at DPI.30-0) and mitochondrial dysfunction ($B\text{-H}=10^{-12}$, $Z\text{-score}=\text{NA}$) were the top enriched canonical pathways in NDA, and were enriched in the genes uniquely DE in NDA, while glycolysis was also enriched, but to a less extent ($B\text{-H}=0.006$, $Z\text{-score}=2.6$ at DPI.20-0). As explained above, cell metabolism and immune cells activation are closely linked ((Pearce and Pearce 2013)), and mitochondria are key organelles not only to provide energy through ATP generation, but also to support macromolecules biosynthesis and intra-cellular pro- or anti-inflammatory signals ((McGettrick and O'Neill 2013), (Weinberg, Sena et al. 2015)). These processes seems thus activated in NDA, with glycolysis that could be associated to a pro-inflammatory component, and more especially oxidative phosphorylation that could be linked to an anti-inflammatory and memory response ((Pearce and Pearce 2013)), while both could be associated to B cells that have a global increase in metabolism ((Caro-Maldonado, Wang et al. 2014)). In support of these observations,

(O'Gorman, Park et al. 2009) hypothesized an increased mitochondrial mRNA translational efficiency in NDA in comparison to Boran. Another top canonical pathway in NDA is the sirtuin signaling pathway ($B-H=5*10^{-7}$, $Z\text{-score}=2.5$ at DPI.20-0), which was inferred as inhibited in all breeds but especially in NDA. The sirtuin pathway comprises several proteins involved in ubiquitous processes and especially in a coupling between metabolic and stress factors and inflammatory responses. They are thought to be involved in hypo-inflammatory response in sepsis ((Wang, Buechler et al. 2018)), whereas SIRT1 has been once described to inhibit Tregs ((Loftus and Finlay 2016)). The inferred inhibition of this pathway could be viewed as a continuous inflammatory process. Within the pathway, SIRT1 and SIRT5 genes were downregulated while SIRT2 was upregulated, and SIRT1 and SIRT2 activation may have different physiological effects depending on the nutritional status of the animal ((Wang, Buechler et al. 2018)). Anyway, enrichment of this pathway and modulation of expression of three sirtuin genes reinforce the importance of the interactions between metabolic processes and immune functions. In the same way, the most inhibited upstream regulator in NDA was RICTOR ($Z\text{-score}=-9.3$ and $P\text{-value}=10^{-11}$ at NDA.40-0) and it was also highly enriched in the genes uniquely DE in NDA. This protein is a member of mTORC2 complex that regulates cell metabolism and is involved in numerous functions, including development ((Guertin, Stevens et al. 2006)), insulin signaling by promoting lipogenesis and glycogen synthesis ((Yoon 2017)), and immune cells functions. RICTOR was shown to be involved in M2 development ((Hallowell, Collins et al. 2017)), Th2 cells and NK cells differentiation while its inhibition promoted Tregs development and enhanced cytotoxic effector function of NK cells ((Delgoffe, Pollizzi et al. 2011), (Wang, Meng et al. 2018)). Significantly enriched in NDA and in LAG.30-0, its state was estimated as highly inhibited in NDA cattle and to a less extent in LAG (LAG.30-0, $P\text{-value}=4*10^{-4}$, $Z\text{-score}=-4.6$), and this may be related to lipid and glucose metabolism and/or immune system regulation.

The most activated upstream regulator in NDA.20-0 was CSF2 (GM-CSF, Z-score=6.97, P-value= 10^{-19}), which is a key cytokine produced by various cells during an infection or an inflammation and is involved in monocytes, macrophages, granulocytes and DC development, proliferation, differentiation, and activation ((van de Laar, Coffier et al. 2012), (Hamilton and Achuthan 2013)). It is involved in diverse phenotypes, as pro-inflammatory ((Fleetwood, Lawrence et al. 2007)), allergic (Willart, Deswarte et al. 2012), or repairing phenotypes ((Huen, Huynh et al. 2015)). MYC was the most activated upstream regulator on the following dates (NDA.30-0 and NDA.40-0). Mainly known as a proto-oncogene, it is also activated in M2 macrophages ((Pello, De Pizzol et al. 2012), (Jablonski, Amici et al. 2015)), and is critical in T cells proliferation and growth following activation ((Wang, Dillon et al. 2011)). The high estimated activation state of CSF2 in NDA could reflect an earlier and greater activation of macrophages in this breed. Interestingly, (Sileghem, Flynn et al. 1993) tested the ability of monocytes, collected from infected Boran Zebu and N'Dama, to stimulate mouse thymocytes and they observed an earlier release of co-stimulatory cytokines by NDA monocytes than by Boran monocytes. Afterwards, the hypothesis of an earlier pro-inflammatory response in PBMC from NDA was proposed by (O'Gorman, Park et al. 2006). CSF2 and MYC were enriched and activated in other breeds, but with less intensity. In addition, NDA showed a particular high-assessed activation state for IL15 and IL5 at DPI.20-0. We could thus hypothesize that trypanotolerance in NDA could be linked to the precocity and the chronology of the activation state of cells, which would allow an efficient immune response while avoiding immune disorders ((Vincendeau and Bouteille 2006)).

In ZFU, the functions, canonical pathways and upstream regulators corresponding to cholesterol and lipid metabolism were particularly enriched and usually activated (i.e. Synthesis of cholesterol, B-H= 10^{-10} , Z-score=2.2 at ZFU.20-0; Superpathway of cholesterol biosynthesis, B-H= 10^{-22} , Z-score=3.7; SREBF2 P-value= 10^{-24} , Z-score=3.9). The fact that cholesterol as an

upstream regulator was assessed as strongly inhibited ($P\text{-value}=10^{-21}$, $Z\text{-score}=-2.9$ at ZFU.20-0) could highlight a profound impact of trypanosomes infection on cholesterol metabolism, through cholesterol consumption. As an example, SREBF2 was assessed as strongly activated by IPA and this gene was it-self upregulated in ZFU transcriptome ($FRD=4*10^{-4}$, $\log FC=0.6$ at ZFU.20-0). This gene is involved in cholesterol homeostasis and its protein (SREBP-2) is activated in case of low intracellular cholesterol level ((Urban, Poss et al. 2013)). These upstream regulators were also enriched in the list of genes uniquely DE in FZU. We could thus hypothesize a strong dysregulation of lipid and cholesterol metabolism in ZFU, from the beginning of the infection.

By comparing cytokine expression of PBMC from Boran and NDA, (O'Gorman, Park et al. 2006) observed a stronger up-regulation of IL10 and IL6 in Boran. In our data set, IL10 was actually upregulated in ZFU (ZFU.20-0 and 30-0), and also in LAG.30-0 and BAO.30-0, but not in NDA neither in BOR. IL6 was also significantly upregulated in all breeds, except in BAO, but with the highest $\log FC$ in ZFU ($\log FC=7$, $FDR=10^{-8}$ at ZFU.30-0). These results are in agreement with those of (O'Gorman, Park et al. 2006). However, IL6R and IL10RB were downregulated from DPI30, and IL10, as an upstream regulator, was assessed as inhibited in ZFU.30-0 ($Z\text{-score}=-2.2$, $P\text{-value}=10^{-7}$), and IL6-signaling was inferred as inhibited from ZFU.30-0 ($Z\text{-score}=-2.1$, $B\text{-H}=10^{-4}$ at ZFU.40-0). These cytokines appeared thus overexpressed in ZFU, but regulatory mechanisms are likely to occur to avoid a too sustained action of these cytokines. Nevertheless, a role of IL10 and IL6 in disease susceptibility can be considered. ZFU displayed also a strong inhibition for IL5, TGFB1 and TNF from DPI.30-0. At last, two canonical pathways, Inflammasome pathway and TREM1 Signaling, were significantly enriched only in ZFU ($B\text{-H value}=10^{-4}$ and 10^{-5} respectively in ZFU.40-0) and Inflammasome pathway was inferred as inhibited in ZFU.40-0 ($Z\text{-score}=-2.1$). These pathways are related to the innate and pro-inflammatory immune response ((Arts, Joosten et al. 2013), (Zamboni and

Lima-Junior 2015)), which appeared thus downregulated in ZFU at the chronic stage of infection.

LAG has always been considered as a trypanotolerant breed and our previous study on phenotypes showed that animals of this breed controlled well the anemia induced by a *T. congolense* infection ((Berthier, Peylhard et al. 2015)). When looking at the PCA representation, transcriptomes of LAG animals were very closed to those of NDA cattle. LAG had less DE genes than NDA, except at 30-0, and the most information was found at this date in terms of functional analyses. However, LAG contrasts did not cluster particularly with NDA contrasts, whatever for genes logFC or for Z-scores of biological functions. Nevertheless, as in NDA, top activated canonical pathways in LAG were oxidative phosphorylation (Z-score=5.6, BH=0.002) and TCA Cycle (BH=0.005, Z-score=3.5) at LAG.30-0, and mitochondrial dysfunction (BH=10⁻³) and Cell Cycle: G2/M DNA Damage Checkpoint Regulation (BH=10⁻³) were enriched. Superpathway of cholesterol biosynthesis was also activated (BH=0.005, Z-score=3.7), but not any diseases and functions linked to cholesterol or lipid metabolism. Diseases and functions linked to hypoplasia (hypoplasia of organs, hypoplasia of thymus gland, hypoplasia of lymphoid organs) were inferred as activated and also cell cycle functions (G2/M phase transition, Interphase, Segregation of chromosomes) as in NDA. Top upstream regulators were also shared with the other breeds, as CSF2, the most enriched and activated upstream regulators at DPI.20-0 (P-value=10⁻⁶, Z-score=3.2), and also HGF, Vegf, MYC and TCF3. GATA3 (P-value=10⁻⁷, Z-score=-2.8) and TBX21 (P-value=10⁻⁷, Z-score=2.5), as upstream regulators, were particularly significant in LAG.40-0, and the genes were themselves downregulated and upregulated respectively at the mRNA level. These genes were reported to be regulated in an opposite manner and involved in T cells regulation, GATA3 being associated to Th2 and TBX21 to Th1 cells ((Chakir, Wang et al. 2003)). TBX21 was also associated to NK cells development and effector functions ((Deng, Kerdiles et al. 2015)). In LAG, a pro-

inflammatory activation of Th1 cells subset or NK could be considered, but results from diseases and functions analysis showed rather an inhibition of T cells (B-H= 10^{-7} , Z-score=-2.1 at LAG.30-0). Nevertheless, other phenomena could be involved because TBX21 was also expressed in B-cells precursors, contrary to GATA3 ((Harashima, Matsuo et al. 2005)) and it was required in B cells, for IFN γ dependent switching in IgG2a production ((Mohr, Cunningham et al. 2010)). By the way, the quantity of IgG2a was activated in our data set (B-H=0.0003, Z-score=1.7 at LAG.40-0).

The BAO breed had a surprising biological response, since this breed displayed the smallest number of DE genes during the infection process, and provided accordingly the less information in functional analyses. On the axis 1 of the PCA, BAO animals were placed slightly at the right of NDA and LAG animals at DPI.0, and contrasts at DPI.20 were close to contrasts at DPI.0: the expression differential is thus less in BAO than in other breeds at this date. Nevertheless, some BAO contrasts at DPI.40 were at the extremity of axis 1, and the highest number of DE genes in BAO was found at DPI.40-0, which provided more information for the functional analysis. Functions associated to cholesterol and lipid metabolism were strongly enriched at DPI.30-0 (metabolism of cholesterol B-H= 10^{-7} , Z-score=2.6), as well as in the canonical pathways (Superpathway of cholesterol biosynthesis BH= 10^{-12} , Z-score=3.9) or for the upstream regulators (SREBF1 P-value= 10^{-13} , Z-score=4.2) as in ZFU. However, TCA cycle was enriched and activated in BAO (BH=0.0004, Z-score=3.3 at DPI.40-0), as it is in NDA, LAG and to a less extent in BOR, but not in ZFU. At the later date, top Z-score in diseases and functions concerned the quantity of Ig and were associated to PI3K Signaling in B lymphocytes (BH= 10^{-3} , Z-score=2.6) and B Cell Receptor Signaling. Thus, responses in BAO showed similar features with those of ZFU concerning cholesterol and lipid metabolism, while it had the highest Z-score in terms of Ig quantities and resemble NDA and LAG for TCA cycle activation.

At last, the BOR is an admixed cattle breed between AFZ and AFT ((Flori, Thevenon et al. 2014)). During the experimental infections, as expected, the BOR displayed an intermediate phenotype concerning the recorded variables, PCV, parasitemia and WBC ((Berthier, Peylhard et al. 2015)). Here, the transcriptomes of BOR cattle were placed at the middle of the PCA axis 2, between the ZFU and the AFT, at a similar position than the one observed in PCA based on genetic markers ((Moazami-Goudarzi, Belemsaga et al. 2001), (Flori, Thevenon et al. 2014)), and whatever the sampling date. The functional analyses did not reveal specific responses in BOR, significant functions being shared with other breeds, as the M phase (activated Z-score=2.1, B-H=0.0004) and the segregation of chromosome (B-H=10⁻⁷) at 20 DPI, strongly enriched in NDA, or the canonical pathways linked to cholesterol metabolism at DPI.30-0 more enriched in ZFU. We observed an early activation of CSF2 (P-value=10⁻²⁰, Z-score=5 at DPI.20-0) and Vegf (P-value=10⁻¹⁰, Z-score=5) as upstream regulators, as well as SREBF2 (P-value=10⁻³, Z-score=3.4) at DPI.40-0.

In response to the infection by trypanosomes, many functions, canonical pathways and upstream regulators were thus shared between breeds, as observed by ((O'Gorman, Park et al. 2009) and (Noyes, Brass et al. 2011)), and there did not seem to be an obvious clustering between ZFU and AFT. Differences between breeds seemed to be linked to temporal variations, intensities, and top functions put forward by the different breeds. What emerges from these analyses was the early and strong perturbation of cholesterol metabolism in ZFU. In the trypanotolerant NDA and LAG, the oxidative phosphorylation was strongly enriched and activated. TCA cycle was significantly activated in NDA, LAG and BAO. These differences in cellular energy could be linked to better functions of some cells type, like M2 macrophages, memory T cells or activated B cells. In ZFU, several canonical pathways linked to inflammation were inhibited from 30 DPI (Inflammasome, p38 MAPK Signaling, and IL-6 Signaling), which was not observed in the other breeds. Accordingly, susceptibility in ZFU could be associated

with a damaging perturbation of lipid metabolism, and impairments of cellular energy balance and immune response regulation.

Initial differences may be important (innate response - adaptive)

Clues on trypanotolerance could be given by differences preceding the infection. Indeed, the axis 2 of the PCA separated animal's primary transcriptomes (at DPI.0) according to breeds, and the BOR animals were placed between AFT (NDA, LAG, BAO) and ZFU, in the same way as they were characterized using SNP markers ((Gautier, Flori et al. 2009), (Flori, Thevenon et al. 2014), (Berthier, Peylhard et al. 2015)). There were few interactions between the basal expression levels and the response to the infection, since transcriptomes underwent roughly a shift along the axis 1 as the infection was changing, and there was not any relevant function enrichment associated to the genes differentially expressed between breeds before the infection. Nevertheless, some genes were shown to be differentially expressed both between breeds at DPI.0 and within-breed during the infection. 82 genes were DE between NDA.0-ZFU.0 and within NDA or ZFU contrasts, and some were involved in important functions highlighted previously and related to cell energy, metabolism or immune response.

For instance MARCO, as pattern recognition receptor in macrophages, is important in pathogen phagocytosis and enhanced cytokines and chemokines expression (((Xu, Flaczyk et al. 2017))). In our data set, basal expression of MARCO was higher in ZFU than in NDA and LAG, while MARCO was significantly upregulated in NDA, LAG, BAO and BOR during the infection, but not in ZFU. MMD (Monocyte to macrophage differentiation-associated) is also a gene expressed during monocyte differentiation and macrophage activation ((Liu, Zheng et al. 2012))), and it was similarly upregulated in ZFU.0 in comparison to NDA.0, and upregulated during the infection in NDA, LAG and BOR. SLC11A1 (syn Nramp1) is also a macrophage gene, and was upregulated in ZFU.0 versus NDA.0, but it was then downregulated in ZFU. This

encoded protein regulates iron homeostasis in macrophage and is involved in macrophages functions and genes variants are associated to diseases susceptibility or resistance ((Archer, Nassif et al. 2015)). Several genes expressed in monocytes and macrophages and responding to the infection were thus differentially expressed between ZFU and other breeds at DPI.0. Other genes associated to the immune response were also DE, as the IL2RA, which is strongly expressed by Treg but also by effector T cells ((Banham, Powrie et al. 2006)), NK cells ((Esin, Counoupas et al. 2013), (Hamilton, Mahan et al. 2017)), and also by granulocytes in cattle ((Zoldan, Moellmer et al. 2014)). IL2RA is involved in effector functions of CD8 T cells and immune homeostasis in Treg ((Liao, Lin et al. 2013)). IL2RA was more expressed in ZFU.0 in comparison to the other breeds, and it was downregulated during the infection and particularly in ZFU. IL2RA was involved in 276 enriched functions identified using IPA. IL2RA, also named CD25, has been the target of research in cattle trypanosomosis, where impairment of IL2RA was noticed in lymph nodes ((Sileghem and Flynn 1992)). In mice, injection of anti-CD25 antibodies before experimental infections with *T. congolense* led ((Okwor, Onyilagha et al. 2012)) to propose a negative role of Tregs in the pathogeny, while ((Guilliams, Oldenhove et al. 2007)) supported a protective role of Tregs. Anyway, the existence of basal differences between ZFU and NDA or other breeds in expression level of genes involved in the immune response could be associated to different proportions of cells type or to different states of cell's activation between breeds. These basal differences could play a role in the subsequent pathogenic process caused by trypanosomes.

Other genes harboring basal differences in their expression level were associated to metabolism regulation. For instance, IGF2, which was upregulated in NDA.0 versus ZFU.0 and decreased during the infection, codes for a peptide hormone that is involved in metabolism, tissue development and maintenance and is downregulated during under-nutrition or hypoglycemia ((Livingstone and Borai 2014)). This latter is consistent with the hypothesis of

glucose consumption by the trypanosomes. GATA1 is a transcription factor involved in erythropoiesis. It was more expressed in NDA.0 and BOR.0 versus ZFU.0, and was then surprisingly downregulated during the infection in NDA (DPI.30-0 and 40-0), LAG (DPI.40-0) and BAO (DPI.40-0). This unexpected result may be due to GATA1 downregulation by heme, due a feedback-loop that occurs during erythrocyte differentiation ((Doty, Yan et al. 2019)). The fact that basal differences in metabolic regulations could be involved in the outcome of trypanosomosis could explain the results obtained by (Naessens, Leak et al. 2003) who monitored trypanotolerant traits in NDA and Boran Zebu chimaeras and suggested that immune response may be not involved in the ability of NDA cattle to control the parasitemia.

Strength/Limitations

Our results suggest thus general features of bovine response to trypanosomosis, as T cells depletion at the chronic stage of infection, macrophages and B cells involvement, and a strong interplay between immune response and metabolism. However, we did not investigate other cellular compartments that could play a role in the onset of the infection, as derma, lymph nodes, liver and spleen. The first steps of the immune response, the encounter of the innate immune cells with trypanosomes at their inoculation point and the trypanosomes antigens presentation by DC to T lymphocytes, were not studied here. Genes expression in liver, spleen and lymph nodes, were studied by ((Noyes, Brass et al. 2011)), who noticed three KEGG pathways (Cytokine-cytokine receptor interaction, MAPK signaling and neurodegenerative disease) that were significantly enriched in genes DE between NDA and Boran Zebu in lymph nodes only. However, and like us, they did not investigate the precocity of the innate immune response that occur few hours after pathogens inoculation or the initiation of the adaptive response that develops in few days ((Pier, Lyczak et al. 2004)). According to our results and those of (O'Gorman, Park et al. 2009), it would be useless to sample blood more precociously,

but derma and lymph nodes would constitute interesting tissues whose early response could be investigated.

Another limitation inherent to our study comes from the fact that the functional interpretation is based on knowledge in human, mouse and rat, retrieved from the bibliography. However, it is known that cattle has specific features, as a high proportion of $\gamma\delta$ T cells and WC1 genes family without orthologues in human and rodents ((Aida, Takeshima et al. 2015)). The lack of functional interpretations specific to cattle could led us to miss important features of the immune response in this species. In addition, as we looked deeply into the dataset and the functional analyses, we observed a strong pleiotropy of many genes (i.e. MYC) and a strong redundancy of molecules whose expression level may be modified by several upstream regulators or may be associated to many functions, more or less redundant. For instance, TNF and TGFB may be responsible for the regulation of many genes, among which a large proportion is shared between these two upstream regulators, while they have different or even opposite functions. Our data set did not allow to decipher which upstream regulator is predominant or to investigate interactions between them. The diseases and functions analysis led us to suppose a depletion of T lymphocytes in the blood during the chronic phase of the infection, but without specifying the subtypes of T cells (CD4-Th1, -Th2, -Th17, -Tregs, CD8). Finally, our study highlights associations between transcriptome modification and the infection course, but we did not infer causative relationships. It is impossible to determine if differences observed between ZFU and NDA concerning the perturbation of cholesterol metabolism were the cause or the consequence of trypanotolerance (i.e. an immunological control of pathogenic effects is likely to improve metabolism homeostasis, or an improved control of metabolism homeostasis is likely to buffer pathogenic effects of trypanosome infection).

Implications on control and research perspectives

This led us to be cautious regarding the interpretation of our results. Overall, in the absence of straightforward differences between breeds, these results corroborate the multigenic feature of the trypanotolerant trait. The QTL analysis performed by (Hanotte, Ronin et al. 2003) demonstrated that the detected QTLs explained a small proportion of the phenotypic variance, and several studies aiming at identifying selection signatures in trypanotolerant cattle highlighted numerous loci harboring selective sweeps ((Gautier, Flori et al. 2009), (Flori, Thevenon et al. 2014), (Kim, Hanotte et al. 2017)). Practically, these results tend to show that a project aiming at associating trypanotolerance and production traits should be based on quantitative genetics principle (with support of genomic selection if possible) without trying to select major loci. Our results suggest the presence of both inflammatory and anti-inflammatory signals and we can suppose that the trypanotolerance of AFT corresponds not only to an efficient immune response but also to a resilient response that is able to balance between pro-inflammatory and anti-inflammatory signals and to buffer metabolic disturbance due to trypanosomes. This ability goes beyond mere trypanotolerance and reflects surely a good adaptation of AFT to global constraints due to the sub-humid environment of West African savannah and forests. This led us to highlight the importance of preserving local breeds that have unique and valuable features linked to global adaptation.

In conclusion, our study provides the first transcriptome profiling of whole blood of five bovine breeds during a trypanosome infection using RNA-seq. The trypanosome infection had a major impact on cattle blood transcriptome, whatever the breed. Our results confirmed previous observations, as a strong regulation of the immune system functions, an early activation of innate immune response, followed by an activation of humoral response and an inhibition of T cells at the chronic stage of infection. However, we highlighted overlooked features, as the strong disturbance in host metabolism and cell production energy. In the

trypanotolerant NDA breed, an early regulation of the immune response was noticed, associated with a strong activation of energy production by the cells. This latter feature was also found in LAG. Conversely, the susceptible ZFU was characterized by a strong disturbance in lipid metabolism. Basal differences in gene expression, reflecting the structuration of cattle genetic diversity, were noticed and could have consequences on the tolerant or susceptible phenotype. Finally, the interactions between the immune response and the metabolism deserve to be deeply explored and could help understanding and counteracting the pathogenic process in cattle.

Acknowledgements

This work was supported by the ANR grant n°2011 JSV6 001 01 (<http://www.agence-nationale-recherche.fr/>) and by the LabEx ParaFrap (ANR-11-LABX-0024). The PhD grant of Mélanie Peylhard was supported by CIRAD PhD grant program and IRD. We thank Guillaume Martin (CIRAD) and Guilhem Sempéré (CIRAD) who provided supports for script writing. The bioinformatics analyses were run on the Southgreen platform (<https://southgreen.fr/>).

References

- Aboagye, G. s., C. L. Tawah and E. Rege (1994). "Shorthorn cattle of West and Central Africa. III. Physical, adaptive and special genetic characteristics." World Animal Review **78**: 22-32.
- Adamu, S., N. Barde, J. N. Abenga, N. M. Useh, N. D. G. Ibrahim and K. A. N. Esievo (2009). "Experimental *Trypanosoma brucei* infection-induced changes in the serum profiles of lipides and cholestreol and the clinical implications in pigs." Journal of cell and animal biology **3**(2): 15-20.
- Aguirre, A., J. Blazquez-Prieto, L. Amado-Rodriguez, I. Lopez-Alonso, E. Batalla-Solis, A. Gonzalez-Lopez, M. Sanchez-Perez, C. Mayoral-Garcia, A. Gutierrez-Fernandez and G. M. Albaiceta (2017). "Matrix metalloproteinase-14 triggers an anti-inflammatory proteolytic cascade in endotoxemia." J Mol Med (Berl) **95**(5): 487-497.
- Ahmed, M. S., S. E. Byeon, Y. Jeong, M. A. Miah, M. Salahuddin, Y. Lee, S. S. Park and Y. S. Bae (2015). "Dab2, a negative regulator of DC immunogenicity, is an attractive molecular target for DC-based immunotherapy." Oncoimmunology **4**(1): e984550.
- Ahsan, F., J. Maertzdorf, U. Gühlich-Bornhof, S. H. E. Kaufmann and P. Moura-Alves (2018). "IL-36/LXR axis modulates cholesterol metabolism and immune defense to Mycobacterium tuberculosis." Sci Rep **8**(1): 1520.

- Aida, Y., S. Takeshima, C. L. Baldwin and A. Kaushik (2015). Bovine immunogenetics. The genetics of cattle. D. J. Garrick and A. Ruvinsky. Pondicherry, India, CABI: 623.
- Akol, G. W., E. Authie, M. Pinder, S. K. Moloo, G. E. Roelants and M. Murray (1986). "Susceptibility and immune responses of zebu and taurine cattle of West Africa to infection with *Trypanosoma congolense* transmitted by *Glossina morsitans centralis*." Vet Immunol Immunopathol **11**(4): 361-373.
- Alsan, M. (2015). "The Effect of the TseTse Fly on African Development." American Economic Review **105**(1): 382-410.
- Alvarez, I., L. Perez-Pardal, A. Traore, I. Fernandez and F. Goyache (2015). "Lack of haplotype structuring for two candidate genes for trypanotolerance in cattle." J Anim Breed Genet.
- Alvarez, I., L. Perez-Pardal, A. Traore, I. Fernandez and F. Goyache (2016). "Lack of specific alleles for the bovine chemokine (C-X-C) receptor type 4 (CXCR4) gene in West African cattle questions its role as a candidate for trypanotolerance." Infect Genet Evol **42**: 30-33.
- Arango Duque, G. and A. Descoteaux (2014). "Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases." Front Immunol **5**: 491.
- Archer, N. S., N. T. Nassif and B. A. O'Brien (2015). "Genetic variants of SLC11A1 are associated with both autoimmune and infectious diseases: systematic review and meta-analysis." Genes Immun **16**(4): 275-283.
- Arredouani, M., Z. Yang, Y. Ning, G. Qin, R. Soininen, K. Tryggvason and L. Kobzik (2004). "The scavenger receptor MARCO is required for lung defense against pneumococcal pneumonia and inhaled particles." J Exp Med **200**(2): 267-272.
- Arts, R. J., L. A. Joosten, J. W. van der Meer and M. G. Netea (2013). "TREM-1: intracellular signaling pathways and interaction with pattern recognition receptors." J Leukoc Biol **93**(2): 209-215.
- Arunachalam, B., U. T. Phan, H. J. Geuze and P. Cresswell (2000). "Enzymatic reduction of disulfide bonds in lysosomes: characterization of a gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase (GILT)." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(2): 745-750.
- Authie, E., D. K. Muteti and D. J. Williams (1993). "Antibody responses to invariant antigens of *Trypanosoma congolense* in cattle of differing susceptibility to trypanosomiasis." Parasite Immunol **15**(2): 101-111.
- Badran, B. M., K. Kunstman, J. Stanton, M. Moschitta, A. Zerghe, H. Akl, A. Burny, S. M. Wolinsky and K. E. Willard-Gallo (2005). "Transcriptional regulation of the human CD3 gamma gene: the TATA-less CD3 gamma promoter functions via an initiator and contiguous Sp-binding elements." J Immunol **174**(10): 6238-6249.
- Baetselier, P. D., B. Namangala, W. Noel, L. Brys, E. Pays and A. Beschin (2001). "Alternative versus classical macrophage activation during experimental African trypanosomiasis." Int J Parasitol **31**(5-6): 575-587.
- Banham, A. H., F. M. Powrie and E. Suri-Payer (2006). "FOXP3+ regulatory T cells: Current controversies and future perspectives." Eur J Immunol **36**(11): 2832-2836.
- Benjamini, Y. and Y. Hochberg (1995). "Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing." J R Stat Soc Series B Stat Methodol **57**: 289-300.
- Berthier, D., M. Peylhard, G. K. Dayo, L. Flori, S. Sylla, S. Bolly, H. Sakande, I. Chantal and S. Thevenon (2015). "A comparison of phenotypic traits related to trypanotolerance in five west african cattle breeds highlights the value of shorthorn taurine breeds." PLoS One **10**(5): e0126498.
- Bischoff, L., S. Alvarez, D. L. Dai, G. Soukhatcheva, P. C. Orban and C. B. Verchere (2015). "Cellular mechanisms of CCL22-mediated attenuation of autoimmune diabetes." J Immunol **194**(7): 3054-3064.

- Boda, C., B. Courtioux, P. Roques, L. Pervieux, G. Vatunga, T. Josenando, C. R. Ayenengoye, B. Bouteille, M. O. Jauberteau and S. Bisser (2009). "Immunophenotypic lymphocyte profiles in human african trypanosomiasis." *PLoS One* **4**(7): e6184.
- Boneschansker, L., H. Nakayama, M. Eisenga, J. Wedel, M. Klagsbrun, D. Irimia and D. M. Briscoe (2016). "Netrin-1 Augments Chemokinesis in CD4+ T Cells In Vitro and Elicits a Proinflammatory Response In Vivo." *J Immunol* **197**(4): 1389-1398.
- Bosschaerts, T., M. Guillems, B. Stijlemans, Y. Morias, D. Engel, F. Tacke, M. Herin, P. De Baetselier and A. Beschin (2010). "Tip-DC development during parasitic infection is regulated by IL-10 and requires CCL2/CCR2, IFN-gamma and MyD88 signaling." *PLoS Pathog* **6**(8): e1001045.
- Bouyer, J., F. Bouyer, M. Donadeu, T. Rowan and G. Napier (2013). "Community- and farmer-based management of animal African trypanosomosis in cattle." *Trends Parasitol* **29**(11): 519-522.
- Bowdish, D. M., K. Sakamoto, M. J. Kim, M. Kroos, S. Mukhopadhyay, C. A. Leifer, K. Tryggvason, S. Gordon and D. G. Russell (2009). "MARCO, TLR2, and CD14 are required for macrophage cytokine responses to mycobacterial trehalose dimycolate and Mycobacterium tuberculosis." *PLoS Pathog* **5**(6): e1000474.
- Budd, L. T. (1999). DFID-funded tsetse and trypanosomiasis research and development since 1980. *Economic Analysis*. U. Department of International Development. London, Department of International Development, UK. **2**: 123.
- Caro-Maldonado, A., R. Wang, A. G. Nichols, M. Kuraoka, S. Milasta, L. D. Sun, A. L. Gavin, E. D. Abel, G. Kelsoe, D. R. Green and J. C. Rathmell (2014). "Metabolic reprogramming is required for antibody production that is suppressed in anergic but exaggerated in chronically BAFF-exposed B cells." *J Immunol* **192**(8): 3626-3636.
- Casella, G., L. Garzetti, A. T. Gatta, A. Finardi, C. Maiorino, F. Ruffini, G. Martino, L. Muzio and R. Furlan (2016). "IL4 induces IL6-producing M2 macrophages associated to inhibition of neuroinflammation in vitro and in vivo." *J Neuroinflammation* **13**(1): 139.
- Chakir, H., H. Wang, D. E. Lefebvre, J. Webb and F. W. Scott (2003). "T-bet/GATA-3 ratio as a measure of the Th1/Th2 cytokine profile in mixed cell populations: predominant role of GATA-3." *J Immunol Methods* **278**(1-2): 157-169.
- Chen, Y., A. T. L. Lun and G. K. Smyth (2014). Differential expression analysis of complex RNA-seq experiments using edgeR. *Statistical Analysis of Next Generation Sequence Data*. S. D. a. D. S. Nettleton. New York, Springer: 51-74.
- CIPEA (1979). Le bétail trypanotolérant d'Afrique occidentale et centrale. CIPEA. Addis Abeba, Ethiopie. **2**: 155.
- Cnops, J., C. De Trez, B. Stijlemans, J. Keirsse, F. Kauffmann, M. Barkhuizen, R. Keeton, L. Boon, F. Brombacher and S. Magez (2015). "NK-, NKT- and CD8-Derived IFNgamma Drives Myeloid Cell Activation and Erythrophagocytosis, Resulting in Trypanosomosis-Associated Acute Anemia." *PLoS Pathog* **11**(6): e1004964.
- Conesa, A., P. Madrigal, S. Tarazona, D. Gomez-Cabrero, A. Cervera, A. McPherson, M. W. Szczesniak, D. J. Gaffney, L. L. Elo, X. Zhang and A. Mortazavi (2016). "A survey of best practices for RNA-seq data analysis." *Genome Biol* **17**(1): 13.
- Correia, C. N., K. E. McLoughlin, N. C. Nalpas, D. A. Magee, J. A. Browne, K. Rue-Albrecht, S. V. Gordon and D. E. MacHugh (2018). "RNA Sequencing (RNA-Seq) Reveals Extremely Low Levels of Reticulocyte-Derived Globin Gene Transcripts in Peripheral Blood From Horses (*Equus caballus*) and Cattle (*Bos taurus*)." *Front Genet* **9**: 278.
- Courtin, D., J. Milet, V. Jamonneau, C. S. Yeminanga, V. K. Kumeso, C. M. Bilengue, C. Betard and A. Garcia (2006). "Association between human African trypanosomiasis and the IL6 gene in a Congolese population." *Infect Genet Evol*.

- Cuenda, A. and J. J. Sanz-Ezquerro (2017). "p38gamma and p38delta: From Spectators to Key Physiological Players." *Trends Biochem Sci* **42**(6): 431-442.
- d'Ieteren, G. D., E. Authie, N. Wissocq and M. Murray (1998). "Trypanotolerance, an option for sustainable livestock production in areas at risk from trypanosomosis." *Rev Sci Tech* **17**(1): 154-175.
- Dagnachew, S., G. Terefe, G. Abebe, D. J. Barry and B. M. Goddeeris (2014). "Comparative biochemical changes in young Zebu cattle experimentally infected with *Trypanosoma vivax* from tsetse infested and non-tsetse infested areas of northwest Ethiopia." *Vet Parasitol* **205**(3-4): 451-459.
- Dayo, G. K., S. Thevenon, D. Berthier, K. Moazami-Goudarzi, C. Denis, G. Cuny, A. Eggen and M. Gautier (2009). "Detection of selection signatures within candidate regions underlying trypanotolerance in outbred cattle populations." *Mol Ecol* **18**(8): 1801-1813.
- De Muylder, G., S. Daulouede, L. Lecordier, P. Uzureau, Y. Morias, J. Van Den Abbeele, G. Caljon, M. Herin, P. Holzmuller, S. Semballa, P. Courtois, L. Vanhamme, B. Stijlemans, P. De Baetselier, M. P. Barrett, J. L. Barlow, A. N. McKenzie, L. Barron, T. A. Wynn, A. Beschin, P. Vincendeau and E. Pays (2013). "A *Trypanosoma brucei* kinesin heavy chain promotes parasite growth by triggering host arginase activity." *PLoS Pathog* **9**(10): e1003731.
- Delgoffe, G. M., K. N. Pollizzi, A. T. Waickman, E. Heikamp, D. J. Meyers, M. R. Horton, B. Xiao, P. F. Worley and J. D. Powell (2011). "The kinase mTOR regulates the differentiation of helper T cells through the selective activation of signaling by mTORC1 and mTORC2." *Nat Immunol* **12**(4): 295-303.
- Deng, Y., Y. Kerdiles, J. Chu, S. Yuan, Y. Wang, X. Chen, H. Mao, L. Zhang, J. Zhang, T. Hughes, Y. Deng, Q. Zhang, F. Wang, X. Zou, C. G. Liu, A. G. Freud, X. Li, M. A. Caligiuri, E. Vivier and J. Yu (2015). "Transcription factor Foxo1 is a negative regulator of natural killer cell maturation and function." *Immunity* **42**(3): 457-470.
- Deschamps, J. Y., M. Desquesnes, L. Dorso, S. Ravel, G. Bossard, M. Charbonneau, A. Garand and F. A. Roux (2016). "Refractory hypoglycaemia in a dog infected with *Trypanosoma congolense*." *Parasite* **23**: 1.
- Deshmane, S. L., S. Kremlev, S. Amini and B. E. Sawaya (2009). "Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview." *J Interferon Cytokine Res* **29**(6): 313-326.
- Dobin, A., C. A. Davis, F. Schlesinger, J. Drenkow, C. Zaleski, S. Jha, P. Batut, M. Chaisson and T. R. Gingeras (2013). "STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner." *Bioinformatics* **29**(1): 15-21.
- Dombrowicz, D., S. Lin, V. Flamand, A. T. Brini, B. H. Koller and J. P. Kinet (1998). "Allergy-associated FcRbeta is a molecular amplifier of IgE- and IgG-mediated in vivo responses." *Immunity* **8**(4): 517-529.
- Doty, R. T., X. Yan, C. Lausted, A. D. Munday, Z. Yang, D. Yi, N. Jabbari, L. Liu, S. B. Keel, Q. Tian and J. L. Abkowitz (2019). "Single-cell analyses demonstrate that a heme-GATA1 feedback loop regulates red cell differentiation." *Blood* **133**(5): 457-469.
- Duleu, S., P. Vincendeau, P. Courtois, S. Semballa, I. Lagroye, S. Daulouede, J. L. Boucher, K. T. Wilson, B. Veyret and A. P. Gobert (2004). "Mouse strain susceptibility to trypanosome infection: an arginase-dependent effect." *J Immunol* **172**(10): 6298-6303.
- Esin, S., C. Counoupas, A. Aulicino, F. L. Brancatisano, G. Maisetta, D. Bottai, M. Di Luca, W. Florio, M. Campa and G. Batoni (2013). "Interaction of *Mycobacterium tuberculosis* cell wall components with the human natural killer cell receptors NKp44 and Toll-like receptor 2." *Scand J Immunol* **77**(6): 460-469.
- Fairlamb, A. H. and A. Cerami (1992). "Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida." *Annu Rev Microbiol* **46**: 695-729.
- Felius, M., M.-L. Beerling, D. S. Buchanan, B. Theunissen, P. A. Koolmees and J. A. Lenstra (2014). "On the History of Cattle Genetic Resources." *Diversity* **6**: 705-750.

- Firth, S. M. and R. C. Baxter (2002). "Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins." *Endocr Rev* **23**(6): 824-854.
- Fleetwood, A. J., T. Lawrence, J. A. Hamilton and A. D. Cook (2007). "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation." *J Immunol* **178**(8): 5245-5252.
- Flori, L., S. Thevenon, G. K. Dayo, M. Senou, S. Sylla, D. Berthier, K. Moazami-Goudarzi and M. Gautier (2014). "Adaptive admixture in the West African bovine hybrid zone: insight from the Borgou population." *Mol Ecol* **23**(13): 3241-3257.
- Flynn, J. N. and M. Sileghem (1991). "The role of the macrophage in induction of immunosuppression in *Trypanosoma congolense*-infected cattle." *Immunology* **74**(2): 310-316.
- Franke, A., T. Balschun, C. Sina, D. Ellinghaus, R. Hasler, G. Mayr, M. Albrecht, M. Wittig, E. Buchert, S. Nikolaus, C. Gieger, H. E. Wichmann, J. Sventoraityte, L. Kupcinskis, C. M. Onnie, M. Gazouli, N. P. Anagnou, D. Strachan, W. L. McArdle, C. G. Mathew, P. Rutgeerts, S. Vermeire, M. H. Vatn, I. s. group, M. Krawczak, P. Rosenstiel, T. H. Karlsen and S. Schreiber (2010). "Genome-wide association study for ulcerative colitis identifies risk loci at 7q22 and 22q13 (IL17REL)." *Nat Genet* **42**(4): 292-294.
- Gansler, J., K. T. Preissner and S. Fischer (2014). "Influence of proinflammatory stimuli on the expression of vascular ribonuclease 1 in endothelial cells." *FASEB J* **28**(2): 752-760.
- Gautier, M., L. Flori, A. Riebler, F. Jaffrezic, D. Laloe, I. Gut, K. Moazami-Goudarzi and J. L. Foulley (2009). "A whole genome Bayesian scan for adaptive genetic divergence in West African cattle." *BMC Genomics* **10**: 550.
- Gobert, A. P., S. Daulouede, M. Lepoivre, J. L. Boucher, B. Bouteille, A. Buguet, R. Cespuglio, B. Veyret and P. Vincendeau (2000). "L-Arginine availability modulates local nitric oxide production and parasite killing in experimental trypanosomiasis." *Infect Immun* **68**(8): 4653-4657.
- Green, H. P., M. Del Pilar Molina Portela, E. N. St Jean, E. B. Lugli and J. Raper (2003). "Evidence for a *Trypanosoma brucei* lipoprotein scavenger receptor." *J Biol Chem* **278**(1): 422-427.
- Guertin, D. A., D. M. Stevens, C. C. Thoreen, A. A. Burds, N. Y. Kalaany, J. Moffat, M. Brown, K. J. Fitzgerald and D. M. Sabatini (2006). "Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1." *Dev Cell* **11**(6): 859-871.
- Guilliams, M., G. Oldenhove, W. Noel, M. Herin, L. Brys, P. Loi, V. Flamand, M. Moser, P. De Baetselier and A. Beschin (2007). "African trypanosomiasis: naturally occurring regulatory T cells favor trypanotolerance by limiting pathology associated with sustained type 1 inflammation." *J Immunol* **179**(5): 2748-2757.
- Hallowell, R. W., S. L. Collins, J. M. Craig, Y. Zhang, M. Oh, P. B. Illei, Y. Chan-Li, C. L. Vigeland, W. Mitzner, A. L. Scott, J. D. Powell and M. R. Horton (2017). "mTORC2 signalling regulates M2 macrophage differentiation in response to helminth infection and adaptive thermogenesis." *Nat Commun* **8**: 14208.
- Hamilton, C. A., S. Mahan, C. R. Bell, B. Villarreal-Ramos, B. Charleston, G. Entrican and J. C. Hope (2017). "Frequency and phenotype of natural killer cells and natural killer cell subsets in bovine lymphoid compartments and blood." *Immunology* **151**(1): 89-97.
- Hamilton, J. A. and A. Achuthan (2013). "Colony stimulating factors and myeloid cell biology in health and disease." *Trends Immunol* **34**(2): 81-89.
- Hanotte, O., Y. Ronin, M. Agaba, P. Nilsson, A. Gelhaus, R. Horstmann, Y. Sugimoto, S. Kemp, J. Gibson, A. Korol, M. Soller and A. Teale (2003). "Mapping of quantitative trait loci controlling trypanotolerance in a cross of tolerant West African N'Dama and susceptible East African Boran cattle." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(13): 7443-7448.

- Hao, S., X. Han, D. Wang, Y. Yang, Q. Li, X. Li and C. H. Qiu (2016). "Critical role of CCL22/CCR4 axis in the maintenance of immune homeostasis during apoptotic cell clearance by splenic CD8alpha(+) CD103(+) dendritic cells." *Immunology* **148**(2): 174-186.
- Harashima, A., Y. Matsuo, H. G. Drexler, A. Okochi, R. Motoda, M. Tanimoto and K. Orita (2005). "Transcription factor expression in B-cell precursor-leukemia cell lines: preferential expression of T-bet." *Leuk Res* **29**(7): 841-848.
- Harden, J. L., S. M. Lewis, S. R. Lish, M. Suarez-Farinas, D. Gareau, T. Lentini, L. M. Johnson-Huang, J. G. Krueger and M. A. Lowes (2016). "The tryptophan metabolism enzyme L-kynureninase is a novel inflammatory factor in psoriasis and other inflammatory diseases." *J Allergy Clin Immunol* **137**(6): 1830-1840.
- Hemphill, A. and C. A. Ross (1995). "Flagellum-mediated adhesion of Trypanosoma congolense to bovine aorta endothelial cells." *Parasitol Res* **81**(5): 412-420.
- Huen, S. C., L. Huynh, A. Marlier, Y. Lee, G. W. Moeckel and L. G. Cantley (2015). "GM-CSF Promotes Macrophage Alternative Activation after Renal Ischemia/Reperfusion Injury." *J Am Soc Nephrol* **26**(6): 1334-1345.
- Hung, W. S., P. Ling, J. C. Cheng, S. S. Chang and C. P. Tseng (2016). "Disabled-2 is a negative immune regulator of lipopolysaccharide-stimulated Toll-like receptor 4 internalization and signaling." *Sci Rep* **6**: 35343.
- Ilboudo, H., R. Bras-Goncalves, M. Camara, L. Flori, O. Camara, H. Sakande, M. Leno, E. Petitdidier, V. Jamonneau and B. Bucheton (2014). "Unravelling human trypanotolerance: IL8 is associated with infection control whereas IL10 and TNFalpha are associated with subsequent disease development." *PLoS Pathog* **10**(11): e1004469.
- Ipseiz, N., S. Uderhardt, C. Scholtysek, M. Steffen, G. Schabbauer, A. Bozec, G. Schett and G. Kronke (2014). "The nuclear receptor Nr4a1 mediates anti-inflammatory effects of apoptotic cells." *J Immunol* **192**(10): 4852-4858.
- Jablonski, K. A., S. A. Amici, L. M. Webb, D. Ruiz-Rosado Jde, P. G. Popovich, S. Partida-Sanchez and M. Guerau-de-Arellano (2015). "Novel Markers to Delineate Murine M1 and M2 Macrophages." *PLoS One* **10**(12): e0145342.
- Jackson, A. P., A. Berry, M. Aslett, H. C. Allison, P. Burton, J. Vavrova-Anderson, R. Brown, H. Browne, N. Corton, H. Hauser, J. Gamble, R. Gilderthorp, L. Marcello, J. McQuillan, T. D. Otto, M. A. Quail, M. J. Sanders, A. van Tonder, M. L. Ginger, M. C. Field, J. D. Barry, C. Hertz-Fowler and M. Berriman (2012). "Antigenic diversity is generated by distinct evolutionary mechanisms in African trypanosome species." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(9): 3416-3421.
- Joseph, S. B., M. N. Bradley, A. Castrillo, K. W. Bruhn, P. A. Mak, L. Pei, J. Hogenesch, M. O'Connell R, G. Cheng, E. Saez, J. F. Miller and P. Tontonoz (2004). "LXR-dependent gene expression is important for macrophage survival and the innate immune response." *Cell* **119**(2): 299-309.
- Kay, J. G., R. Z. Murray, J. K. Pagan and J. L. Stow (2006). "Cytokine secretion via cholesterol-rich lipid raft-associated SNAREs at the phagocytic cup." *J Biol Chem* **281**(17): 11949-11954.
- Kierstein, S., H. Noyes, J. Naessens, Y. Nakamura, C. Pritchard, J. Gibson, S. Kemp and A. Brass (2006). "Gene expression profiling in a mouse model for African trypanosomiasis." *Genes Immun* **7**(8): 667-679.
- Kim, J., O. Hanotte, O. A. Mwai, T. Dessie, S. Bashir, B. Diallo, M. Agaba, K. Kim, W. Kwak, S. Sung, M. Seo, H. Jeong, T. Kwon, M. Taye, K. D. Song, D. Lim, S. Cho, H. J. Lee, D. Yoon, S. J. Oh, S. Kemp, H. K. Lee and H. Kim (2017). "The genome landscape of indigenous African cattle." *Genome Biol* **18**(1): 34.
- Kos, J., A. Sekirnik, A. Premzl, V. Zavasnik Bergant, T. Langerholc, B. Turk, B. Werle, R. Golouh, U. Repnik, M. Jeras and V. Turk (2005). "Carboxypeptidases cathepsins X and B display distinct protein profile in human cells and tissues." *Exp Cell Res* **306**(1): 103-113.

- Kramer, A., J. Green, J. Pollard, Jr. and S. Tugendreich (2014). "Causal analysis approaches in Ingenuity Pathway Analysis." *Bioinformatics* **30**(4): 523-530.
- Krishnan, S., V. G. Warke, M. P. Nambiar, H. K. Wong, G. C. Tsokos and D. L. Farber (2001). "Generation and biochemical analysis of human effector CD4 T cells: alterations in tyrosine phosphorylation and loss of CD3zeta expression." *Blood* **97**(12): 3851-3859.
- Le Cao, K.-A., F. Rohart, I. Gonzales, S. Dejean, B. Gautier, F. Bartolo, P. Monget, J. Coquery, F. Yao and B. Liquet. (2016). "mixOmics: Omics Data Integration Project." from R package version 6.1.1. <https://CRAN.R-project.org/package=mixOmics>.
- Lejon, V., D. Mumba Ngoyi, L. Kestens, L. Boel, B. Barbe, V. Kande Betu, J. van Griensven, E. Bottieau, J. J. Muyembe Tamfum, J. Jacobs and P. Buscher (2014). "Gambiense human african trypanosomiasis and immunological memory: effect on phenotypic lymphocyte profiles and humoral immunity." *PLoS Pathog* **10**(3): e1003947.
- Li, H., B. Handsaker, A. Wysoker, T. Fennell, J. Ruan, N. Homer, G. Marth, G. Abecasis, R. Durbin and S. Genome Project Data Processing (2009). "The Sequence Alignment/Map format and SAMtools." *Bioinformatics* **25**(16): 2078-2079.
- Liao, W., J. X. Lin and W. J. Leonard (2013). "Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy." *Immunity* **38**(1): 13-25.
- Liao, Y., G. K. Smyth and W. Shi (2014). "featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features." *Bioinformatics* **30**(7): 923-930.
- Liu, Q., J. Zheng, D. D. Yin, J. Xiang, F. He, Y. C. Wang, L. Liang, H. Y. Qin, L. Liu, Y. M. Liang and H. Han (2012). "Monocyte to macrophage differentiation-associated (MMD) positively regulates ERK and Akt activation and TNF-alpha and NO production in macrophages." *Mol Biol Rep* **39**(5): 5643-5650.
- Livingstone, C. and A. Borai (2014). "Insulin-like growth factor-II: its role in metabolic and endocrine disease." *Clin Endocrinol (Oxf)* **80**(6): 773-781.
- Loftus, R. M. and D. K. Finlay (2016). "Immunometabolism: Cellular Metabolism Turns Immune Regulator." *J Biol Chem* **291**(1): 1-10.
- Loken, M. R., V. O. Shah, K. L. Dattilio and C. I. Civin (1987). "Flow cytometric analysis of human bone marrow. II. Normal B lymphocyte development." *Blood* **70**(5): 1316-1324.
- Lutje, V., B. Mertens, A. Boulange, D. J. Williams and E. Authie (1995). "Trypanosoma congolense: proliferative responses and interleukin production in lymph node cells of infected cattle." *Exp Parasitol* **81**(2): 154-164.
- Lutje, V., K. A. Taylor, D. Kennedy, E. Authie, A. Boulange and G. Gettinby (1996). "Trypanosoma congolense: a comparison of T-cell-mediated responses in lymph nodes of trypanotolerant and trypanosusceptible cattle during primary infection." *Exp Parasitol* **84**(3): 320-329.
- Magez, S., M. Radwanska, M. Drennan, L. Fick, T. N. Baral, N. Allie, M. Jacobs, S. Nedospasov, F. Brombacher, B. Ryffel and P. De Baetselier (2007). "Tumor necrosis factor (TNF) receptor-1 (TNFp55) signal transduction and macrophage-derived soluble TNF are crucial for nitric oxide-mediated Trypanosoma congolense parasite killing." *J Infect Dis* **196**(6): 954-962.
- Magez, S., M. Radwanska, M. Drennan, L. Fick, T. N. Baral, F. Brombacher and P. De Baetselier (2006). "Interferon-gamma and nitric oxide in combination with antibodies are key protective host immune factors during trypanosoma congolense Tc13 Infections." *J Infect Dis* **193**(11): 1575-1583.
- Maher, K., B. Jeric Kokelj, M. Butinar, G. Mikhaylov, M. Mancek-Keber, V. Stoka, O. Vasiljeva, B. Turk, S. A. Grigoryev and N. Kopitar-Jerala (2014). "A role for stefin B (cystatin B) in inflammation and endotoxemia." *J Biol Chem* **289**(46): 31736-31750.
- Martinez, F. O. and S. Gordon (2014). "The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment." *F1000Prime Rep* **6**: 13.

- Matthews, K. R., R. McCulloch and L. J. Morrison (2015). "The within-host dynamics of African trypanosome infections." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **370**(1675).
- Mattioli, R. C., U. Feldmann, G. Hendrickx, W. Wint, J. Jannin and J. Slingenbergh (2004). "Tsetse and trypanosomiasis intervention policies supporting sustainable animal-agricultural development." *Journal of Food Agriculture & Environment* **2**(2): 310-314.
- McCarthy, D. J., Y. Chen and G. K. Smyth (2012). "Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation." *Nucleic Acids Res* **40**(10): 4288-4297.
- McGettrick, A. F., S. E. Corcoran, P. J. Barry, J. McFarland, C. Cres, A. M. Curtis, E. Franklin, S. C. Corr, K. H. Mok, E. P. Cummins, C. T. Taylor, L. A. O'Neill and D. P. Nolan (2016). "Trypanosoma brucei metabolite indolepyruvate decreases HIF-1alpha and glycolysis in macrophages as a mechanism of innate immune evasion." *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**(48): E7778-E7787.
- McGettrick, A. F. and L. A. O'Neill (2013). "How metabolism generates signals during innate immunity and inflammation." *J Biol Chem* **288**(32): 22893-22898.
- Metcalfe, S. M. (2011). "LIF in the regulation of T-cell fate and as a potential therapeutic." *Genes Immun* **12**(3): 157-168.
- Meyer, A., H. R. Holt, R. Selby and J. Guitian (2016). "Past and Ongoing Tsetse and Animal Trypanosomiasis Control Operations in Five African Countries: A Systematic Review." *PLoS Negl Trop Dis* **10**(12): e0005247.
- Mills, C. D., K. Kincaid, J. M. Alt, M. J. Heilman and A. M. Hill (2000). "M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm." *J Immunol* **164**(12): 6166-6173.
- Mills, E. L., B. Kelly, A. Logan, A. S. H. Costa, M. Varma, C. E. Bryant, P. Tourlomousis, J. H. M. Dabritz, E. Gottlieb, I. Latorre, S. C. Corr, G. McManus, D. Ryan, H. T. Jacobs, M. Szibor, R. J. Xavier, T. Braun, C. Frezza, M. P. Murphy and L. A. O'Neill (2016). "Succinate Dehydrogenase Supports Metabolic Repurposing of Mitochondria to Drive Inflammatory Macrophages." *Cell* **167**(2): 457-470 e413.
- Mishra, D., S. Singh and G. Narayan (2016). "Role of B Cell Development Marker CD10 in Cancer Progression and Prognosis." *Mol Biol Int* **2016**: 4328697.
- Miyamoto, Y., M. Futamura, N. Kitamura, Y. Nakamura, H. Baba and H. Arakawa (2010). "Identification of UNC5A as a novel transcriptional target of tumor suppressor p53 and a regulator of apoptosis." *Int J Oncol* **36**(5): 1253-1260.
- Moazami-Goudarzi, K., D. Belemsaga, G. Ceriotti, D. Laloe, F. Fagbohoun, N. T. Kouagou, I. Sidibe, V. Codjia, M. C. Crimella, F. Grosclaude and S. M. Touré (2001). "Caractérisation génétique de la race bovine Somba à l'aide de marqueurs moléculaires." *Revue d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux* **54**(2): 129-138.
- Mohr, E., A. F. Cunningham, K. M. Toellner, S. Bobat, R. E. Coughlan, R. A. Bird, I. C. MacLennan and K. Serre (2010). "IFN- γ produced by CD8 T cells induces T-bet-dependent and -independent class switching in B cells in responses to alum-precipitated protein vaccine." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(40): 17292-17297.
- Morias, Y., C. Abels, D. Laoui, E. Van Overmeire, M. Williams, E. Schouppe, F. Tacke, C. J. deVries, P. De Baetselier and A. Beschin (2015). "Ly6C- Monocytes Regulate Parasite-Induced Liver Inflammation by Inducing the Differentiation of Pathogenic Ly6C+ Monocytes into Macrophages." *PLoS Pathog* **11**(5): e1004873.
- Morrison, L. J., S. McLellan, L. Sweeney, C. N. Chan, A. MacLeod, A. Tait and C. M. Turner (2010). "Role for parasite genetic diversity in differential host responses to Trypanosoma brucei infection." *Infect Immun* **78**(3): 1096-1108.
- Morrison, L. J., L. Vezza, T. Rowan and J. C. Hope (2016). "Animal African Trypanosomiasis: Time to Increase Focus on Clinically Relevant Parasite and Host Species." *Trends Parasitol* **32**(8): 599-607.

- Mou, Z., P. Jia, S. Kuriakose, F. Khadem and J. E. Uzonna (2010). "Interleukin-17-mediated control of parasitemia in experimental *Trypanosoma congolense* infection in mice." *Infect Immun* **78**(12): 5271-5279.
- Murray, M., J. C. Trail and G. D. D'Ieteren (1990). "Trypanotolerance in cattle and prospects for the control of trypanosomiasis by selective breeding." *Rev Sci Tech* **9**(2): 369-386.
- Murray, M., J. C. Trail, C. E. Davis and S. J. Black (1984). "Genetic resistance to African Trypanosomiasis." *J Infect Dis* **149**(3): 311-319.
- Murray, P. J. and T. A. Wynn (2011). "Protective and pathogenic functions of macrophage subsets." *Nat Rev Immunol* **11**(11): 723-737.
- Murtagh, F. and P. Legendre (2014). "Ward's hierarchical agglomerative clustering method: which algorithm implements Ward's criterion? ." *Journal of classification* **31**: 274-295.
- Naessens, J., S. G. Leak, D. J. Kennedy, S. J. Kemp and A. J. Teale (2003). "Responses of bovine chimaeras combining trypanosomosis resistant and susceptible genotypes to experimental infection with *Trypanosoma congolense*." *Vet Parasitol* **111**(2-3): 125-142.
- Naessens, J. and D. J. Williams (1992). "Characterization and measurement of CD5+ B cells in normal and *Trypanosoma congolense*-infected cattle." *Eur J Immunol* **22**(7): 1713-1718.
- Nayak, R. C., L. R. Trump, B. J. Aronow, K. Myers, P. Mehta, T. Kalfa, A. M. Wellendorf, C. A. Valencia, P. J. Paddison, M. S. Horwitz, H. L. Grimes, C. Lutzko and J. A. Cancelas (2015). "Pathogenesis of ELANE-mutant severe neutropenia revealed by induced pluripotent stem cells." *J Clin Invest* **125**(8): 3103-3116.
- Ndoutamia, G., R. N. Mbakasse, A. Brahim and A. Khadidja (2002). "Influence de la Trypanosomose à *T. congolense* sur les paramètres hématologiques, minéraux et protéo-énergétiques chez les chèvres sahéliennes du Tchad." *Revue Méd. Vét.* **153**(6): 395-400.
- Newsholme, P., R. Curi, S. Gordon and E. A. Newsholme (1986). "Metabolism of glucose, glutamine, long-chain fatty acids and ketone bodies by murine macrophages." *Biochem J* **239**(1): 121-125.
- Noel, W., G. Hassanzadeh, G. Raes, B. Namangala, I. Daems, L. Brys, F. Brombacher, P. D. Baetselier and A. Beschin (2002). "Infection stage-dependent modulation of macrophage activation in *Trypanosoma congolense*-resistant and -susceptible mice." *Infect Immun* **70**(11): 6180-6187.
- Nowyhed, H. N., T. R. Huynh, G. D. Thomas, A. Blatchley and C. C. Hedrick (2015). "Cutting Edge: The Orphan Nuclear Receptor Nr4a1 Regulates CD8+ T Cell Expansion and Effector Function through Direct Repression of Irf4." *J Immunol* **195**(8): 3515-3519.
- Noyes, H., A. Brass, I. Obara, S. Anderson, A. L. Archibald, D. G. Bradley, P. Fisher, A. Freeman, J. Gibson, M. Gicheru, L. Hall, O. Hanotte, H. Hulme, D. McKeever, C. Murray, S. J. Oh, C. Tate, K. Smith, M. Tapio, J. Wambugu, D. J. Williams, M. Agaba and S. J. Kemp (2011). "Genetic and expression analysis of cattle identifies candidate genes in pathways responding to *Trypanosoma congolense* infection." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(22): 9304-9309.
- O'Gorman, G. M., S. D. Park, E. W. Hill, K. G. Meade, P. M. Coussens, M. Agaba, J. Naessens, S. J. Kemp and D. E. MacHugh (2009). "Transcriptional profiling of cattle infected with *Trypanosoma congolense* highlights gene expression signatures underlying trypanotolerance and trypanosusceptibility." *BMC Genomics* **10**: 207.
- O'Gorman, G. M., S. D. Park, E. W. Hill, K. G. Meade, L. C. Mitchell, M. Agaba, J. P. Gibson, O. Hanotte, J. Naessens, S. J. Kemp and D. E. MacHugh (2006). "Cytokine mRNA profiling of peripheral blood mononuclear cells from trypanotolerant and trypanosusceptible cattle infected with *Trypanosoma congolense*." *Physiol Genomics* **28**(1): 53-61.
- Obermajer, N., U. Svajger, M. Bogyo, M. Jeras and J. Kos (2008). "Maturation of dendritic cells depends on proteolytic cleavage by cathepsin X." *J Leukoc Biol* **84**(5): 1306-1315.

- Okwor, I., C. Onyilagha, S. Kuriakose, Z. Mou, P. Jia and J. E. Uzonna (2012). "Regulatory T cells enhance susceptibility to experimental Trypanosoma congolense infection independent of mouse genetic background." *PLoS Negl Trop Dis* **6**(7): e1761.
- Onyilagha, C., P. Jia, N. Jayachandran, S. Hou, I. Okwor, S. Kuriakose, A. Marshall and J. E. Uzonna (2015). "The B cell adaptor molecule Bam32 is critically important for optimal antibody response and resistance to Trypanosoma congolense infection in mice." *PLoS Negl Trop Dis* **9**(4): e0003716.
- Onyilagha, C., S. Kuriakose, N. Ikeogu, P. Jia and J. Uzonna (2018). "Myeloid-Derived Suppressor Cells Contribute to Susceptibility to Trypanosoma congolense Infection by Suppressing CD4(+) T Cell Proliferation and IFN-gamma Production." *J Immunol* **201**(2): 507-515.
- Paillard, F., G. Sterkers and C. Vaquero (1990). "Transcriptional and post-transcriptional regulation of TcR, CD4 and CD8 gene expression during activation of normal human T lymphocytes." *EMBO J* **9**(6): 1867-1872.
- Pearce, E. L. and E. J. Pearce (2013). "Metabolic pathways in immune cell activation and quiescence." *Immunity* **38**(4): 633-643.
- Pello, O. M., M. De Pizzol, M. Mirolo, L. Soucek, L. Zammataro, A. Amabile, A. Doni, M. Nebuloni, L. B. Swigart, G. I. Evan, A. Mantovani and M. Locati (2012). "Role of c-MYC in alternative activation of human macrophages and tumor-associated macrophage biology." *Blood* **119**(2): 411-421.
- Pier, G., J. Lyczak and L. Wetzler (2004). Time course of a Typical Immune Response. *Immunology, Infection, and Immunity*. G. Pier, J. Lyczak and L. Wetzler. Washington, DC, ASM Press: 718.
- Pierre, C. (1906). L'élevage en Afrique occidentale française. A. Challamel. Paris, Gouvernement général de l'Afrique occidentale française, Inspection de l'agriculture: 280.
- Pinder, M., J. Bauer, A. Van Melick and F. Fumoux (1988). "Immune responses of trypanoresistant and trypanosusceptible cattle after cyclic infection with Trypanosoma congolense." *Vet Immunol Immunopathol* **18**(3): 245-257.
- Risco, A., C. del Fresno, A. Mambol, D. Alsina-Beauchamp, K. F. MacKenzie, H. T. Yang, D. F. Barber, C. Morcelle, J. S. Arthur, S. C. Ley, C. Ardavin and A. Cuenda (2012). "p38gamma and p38delta kinases regulate the Toll-like receptor 4 (TLR4)-induced cytokine production by controlling ERK1/2 protein kinase pathway activation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(28): 11200-11205.
- Ritchie, M. E., B. Phipson, D. Wu, Y. Hu, C. W. Law, W. Shi and G. K. Smyth (2015). "limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies." *Nucleic Acids Res* **43**(7): e47.
- Robinson, M. D., D. J. McCarthy and G. K. Smyth (2010). "edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data." *Bioinformatics* **26**(1): 139-140.
- Robinson, M. D. and A. Oshlack (2010). "A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data." *Genome Biol* **11**(3): R25.
- Roy, A., G. Ganesh, H. Sippola, S. Bolin, O. Sawesi, A. Dagalv, S. M. Schlenner, T. Feyerabend, H. R. Rodewald, L. Kjellen, L. Hellman and M. Abrink (2014). "Mast cell chymase degrades the alarmins heat shock protein 70, biglycan, HMGB1, and interleukin-33 (IL-33) and limits danger-induced inflammation." *J Biol Chem* **289**(1): 237-250.
- Scheller, J., A. Chalaris, D. Schmidt-Arras and S. Rose-John (2011). "The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6." *Biochim Biophys Acta* **1813**(5): 878-888.
- Schultz, H. and J. P. Weiss (2007). "The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in infection and inflammatory disease." *Clin Chim Acta* **384**(1-2): 12-23.

- Sileghem, M. and J. N. Flynn (1992). "Suppression of interleukin 2 secretion and interleukin 2 receptor expression during tsetse-transmitted trypanosomiasis in cattle." Eur J Immunol **22**(3): 767-773.
- Sileghem, M. R., J. N. Flynn, R. Saya and D. J. Williams (1993). "Secretion of co-stimulatory cytokines by monocytes and macrophages during infection with *Trypanosoma* (Nannomonas) congolense in susceptible and tolerant cattle." Vet Immunol Immunopathol **37**(2): 123-134.
- Stijlemans, B., L. Leng, L. Brys, A. Sparkes, L. Vansintjan, G. Caljon, G. Raes, J. Van Den Abbeele, J. A. Van Ginderachter, A. Beschijn, R. Bucala and P. De Baetselier (2014). "MIF Contributes to *Trypanosoma brucei* Associated Immunopathogenicity Development." PLoS Pathog **10**(9): e1004414.
- Stijlemans, B., M. Radwanska, C. De Trez and S. Magez (2017). "African Trypanosomes Undermine Humoral Responses and Vaccine Development: Link with Inflammatory Responses?" Front Immunol **8**: 582.
- Swallow, B. M. (2000). Impacts of Trypanosomiasis on African agriculture. PAAT Technical and scientific series 2. Rome, Italy, FAO (Food and Agricultural Organization of the United Nations): 46.
- Tabel, H., G. Wei and M. Shi (2008). "T cells and immunopathogenesis of experimental African trypanosomiasis." Immunol Rev **225**: 128-139.
- Tanaka, T., M. Narazaki and T. Kishimoto (2014). "IL-6 in inflammation, immunity, and disease." Cold Spring Harb Perspect Biol **6**(10): a016295.
- Taylor, K., V. Lutje and B. Mertens (1996). "Nitric oxide synthesis is depressed in *Bos indicus* cattle infected with *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma vivax* and does not mediate T-cell suppression." Infect Immun **64**(10): 4115-4122.
- Taylor, K., B. Mertens, V. Lutje and R. Saya (1998). "*Trypanosoma congolense* infection of trypanotolerant N'Dama (*Bos taurus*) cattle is associated with decreased secretion of nitric oxide by interferon-gamma-activated monocytes and increased transcription of interleukin-10." Parasite Immunol **20**(9): 421-429.
- Taylor, K. A. (1998). "Immune responses of cattle to African trypanosomes: protective or pathogenic?" Int J Parasitol **28**(2): 219-240.
- Taylor, K. A., V. Lutje, D. Kennedy, E. Authie, A. Boulange, L. Logan-Henfrey, B. Gichuki and G. Gettinby (1996). "*Trypanosoma congolense*: B-lymphocyte responses differ between trypanotolerant and trypanosusceptible cattle." Exp Parasitol **83**(1): 106-116.
- Taylor, K. A. and B. Mertens (1999). "Immune response of cattle infected with African trypanosomes." Mem Inst Oswaldo Cruz **94**(2): 239-244.
- Team, R. D. C. (2008). R: A language and environment for statistical computing. . R. F. f. S. Computing. Vienna, Austria.
- Thuong, N. T., T. T. Tram, T. D. Dinh, P. V. Thai, D. Heemskerk, N. D. Bang, T. T. Chau, D. G. Russell, G. E. Thwaites, T. R. Hawn, M. Caws and S. J. Dunstan (2016). "MARCO variants are associated with phagocytosis, pulmonary tuberculosis susceptibility and Beijing lineage." Genes Immun **17**(7): 419-425.
- Trail, J. C., G. D. d'Ieteren, J. C. Maille and G. Yangari (1991). "Genetic aspects of control of anaemia development in trypanotolerant N'Dama cattle." Acta Trop **48**(4): 285-291.
- Traore-Leroux, T., F. Fumoux and M. Pinder (1987). "High density lipoprotein levels in the serum of trypanosensitive and trypanoresistant cattle. Changes during *Trypanosoma congolense* infection." Acta Trop **44**(3): 315-323.
- Uilenberg, G. (1998). A field guide for the diagnosis, treatment and prevention of African animal trypanosomiasis. Rome, FAO.
- Ullah, U., P. Tripathi, R. Lahesmaa and K. V. Rao (2012). "Gene set enrichment analysis identifies LIF as a negative regulator of human Th2 cell differentiation." Sci Rep **2**: 464.

- Urban, D., J. Poss, M. Bohm and U. Laufs (2013). "Targeting the proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 for the treatment of dyslipidemia and atherosclerosis." J Am Coll Cardiol **62**(16): 1401-1408.
- Uzonna, J. E., R. S. Kaushik, Y. Zhang, J. R. Gordon and H. Tabel (1998). "Experimental murine Trypanosoma congolense infections. II. Role of splenic adherent CD3+Thy1.2+ TCR-alpha beta- gamma delta- CD4+8- and CD3+Thy1.2+ TCR-alpha beta- gamma delta- CD4-8- cells in the production of IL-4, IL-10, and IFN-gamma and in trypanosome-elicited immunosuppression." J Immunol **161**(11): 6189-6197.
- van de Laar, L., P. J. Coffey and A. M. Woltman (2012). "Regulation of dendritic cell development by GM-CSF: molecular control and implications for immune homeostasis and therapy." Blood **119**(15): 3383-3393.
- Van Den Akker, E. L., J. W. Koper, A. L. Boehmer, A. P. Themmen, M. Verhoef-Post, M. A. Timmerman, B. J. Otten, S. L. Drop and F. H. De Jong (2002). "Differential inhibition of 17alpha-hydroxylase and 17,20-lyase activities by three novel missense CYP17 mutations identified in patients with P450c17 deficiency." J Clin Endocrinol Metab **87**(12): 5714-5721.
- Van der Waaij, E. H., O. Hanotte, J. A. M. Van Arendonk, S. J. Kemp, D. Kennedy, A. Gibson and A. Teale (2003). "Population parameters for traits defining trypanotolerance in a F2 cross of N'Dama and Boran cattle." Livest Sci **84**: 219-230.
- Vincendeau, P. and B. Bouteille (2006). "Immunology and immunopathology of African trypanosomiasis." An Acad Bras Cienc **78**(4): 645-665.
- Vulcano, M., C. Albanesi, A. Stoppacciaro, R. Bagnati, G. D'Amico, S. Struyf, P. Transidico, R. Bonecchi, A. Del Prete, P. Allavena, L. P. Ruco, C. Chiabrando, G. Girolomoni, A. Mantovani and S. Sozzani (2001). "Dendritic cells as a major source of macrophage-derived chemokine/CCL22 in vitro and in vivo." Eur J Immunol **31**(3): 812-822.
- Wang, F., M. Meng, B. Mo, Y. Yang, Y. Ji, P. Huang, W. Lai, X. Pan, T. You, H. Luo, X. Guan, Y. Deng, S. Yuan, J. Chu, M. Namaka, T. Hughes, L. Ye, J. Yu, X. Li and Y. Deng (2018). "Crosstalks between mTORC1 and mTORC2 variagate cytokine signaling to control NK maturation and effector function." Nat Commun **9**(1): 4874.
- Wang, L. M., Y. Zhang, X. Li, M. L. Zhang, L. Zhu, G. X. Zhang and Y. M. Xu (2018). "Nr4a1 plays a crucial modulatory role in Th1/Th17 cell responses and CNS autoimmunity." Brain Behav Immun **68**: 44-55.
- Wang, R., C. P. Dillon, L. Z. Shi, S. Milasta, R. Carter, D. Finkelstein, L. L. McCormick, P. Fitzgerald, H. Chi, J. Munger and D. R. Green (2011). "The transcription factor Myc controls metabolic reprogramming upon T lymphocyte activation." Immunity **35**(6): 871-882.
- Wang, X., N. L. Buechler, A. G. Woodruff, D. L. Long, M. Zabalawi, B. K. Yoza, C. E. McCall and V. Vachharajani (2018). "Sirtuins and Immuno-Metabolism of Sepsis." Int J Mol Sci **19**(9).
- Wang, Y., P. M. Rogers, C. Su, G. Varga, K. R. Staybrook and T. P. Burris (2008). "Regulation of cholesterologenesis by the oxysterol receptor, LXRalpha." J Biol Chem **283**(39): 26332-26339.
- Weinberg, S. E., L. A. Sena and N. S. Chandel (2015). "Mitochondria in the regulation of innate and adaptive immunity." Immunity **42**(3): 406-417.
- West, L. C. and P. Cresswell (2013). "Expanding roles for GILT in immunity." Curr Opin Immunol **25**(1): 103-108.
- Westermann, A. J., K. U. Forstner, F. Amman, L. Barquist, Y. Chao, L. N. Schulte, L. Muller, R. Reinhardt, P. F. Stadler and J. Vogel (2016). "Dual RNA-seq unveils noncoding RNA functions in host-pathogen interactions." Nature.
- Wickham, H. (2016). ggplot2: Elegant graphics for data analysis. New York, Springer International Publishing.

- Willart, M. A., K. Deswarte, P. Pouliot, H. Braun, R. Beyaert, B. N. Lambrecht and H. Hammad (2012). "Interleukin-1alpha controls allergic sensitization to inhaled house dust mite via the epithelial release of GM-CSF and IL-33." J Exp Med **209**(8): 1505-1517.
- Wolf, J. B. (2013). "Principles of transcriptome analysis and gene expression quantification: an RNA-seq tutorial." Mol Ecol Resour **13**(4): 559-572.
- Xu, J., A. Flaczyk, L. M. Neal, Z. Fa, A. J. Eastman, A. N. Malachowski, D. Cheng, B. B. Moore, J. L. Curtis, J. J. Osterholzer and M. A. Olszewski (2017). "Scavenger Receptor MARCO Orchestrates Early Defenses and Contributes to Fungal Containment during Cryptococcal Infection." J Immunol **198**(9): 3548-3557.
- Yoon, M. S. (2017). "The Role of Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) in Insulin Signaling." Nutrients **9**(11).
- York, W., A. Adams and F. Murgatroyd (1929). "Studies in chemotherapy. I. A method for maintaining pathogenic trypanosomes alive in vitro at 37 —————C. for 24 hours." Annals of tropical medicine and parasitology **23**: 501-518.
- Zamboni, D. S. and D. S. Lima-Junior (2015). "Inflammasomes in host response to protozoan parasites." Immunol Rev **265**(1): 156-171.
- Zhao, X., T. L. Alves e Silva, L. Cronin, A. F. Savage, M. O'Neill, B. Nerima, L. M. Okedi and S. Aksoy (2015). "Immunogenicity and Serological Cross-Reactivity of Saliva Proteins among Different Tsetse Species." PLoS Negl Trop Dis **9**(8): e0004038.
- Zoldan, K., T. Moellmer, J. Schneider, C. Fuedner, J. Knauer and J. Lehmann (2014). "Increase of CD25 expression on bovine neutrophils correlates with disease severity in post-partum and early lactating dairy cows." Dev Comp Immunol **47**(2): 254-263.

Annexe 2

Berthier, D., M. Peylhard, G. K. Dayo, L. Flori, S. Sylla, S. Bolly, H. Sakande, I. Chantal and S. Thevenon (2015). "A comparison of phenotypic traits related to trypanotolerance in five west african cattle breeds highlights the value of shorthorn taurine breeds." PLoS One 10(5): e0126498.

RESEARCH ARTICLE

A Comparison of Phenotypic Traits Related to Trypanotolerance in Five West African Cattle Breeds Highlights the Value of Shorthorn Taurine Breeds

David Berthier¹, Moana Peylhard^{1,2}, Guiguigbaza-Kossigan Dayo², Laurence Flori^{1,3}, Souleymane Sylla², Seydou Bolly², Hassane Sakande², Isabelle Chantal¹, Sophie Thevenon^{1*}

1 CIRAD, UMR INTERTRYP, F-34398, Montpellier, France, **2** CIRDES, 01 BP 454 Bobo-Dioulasso 01, Burkina Faso, **3** INRA, UMR 1313 GABI, F-78350, Jouy-en-Josas, France

* sophie.thevenon@cirad.fr



Abstract

OPEN ACCESS

Citation: Berthier D, Peylhard M, Dayo G-K, Flori L, Sylla S, Bolly S, et al. (2015) A Comparison of Phenotypic Traits Related to Trypanotolerance in Five West African Cattle Breeds Highlights the Value of Shorthorn Taurine Breeds. PLoS ONE 10(5): e0126498. doi:10.1371/journal.pone.0126498

Received: December 1, 2014

Accepted: April 2, 2015

Published: May 8, 2015

Copyright: © 2015 Berthier et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: Raw phenotypic data used in the manuscript are in [S2 Table](#).

Funding: This work was supported by the ANR grant n°2011 JSV6 001 01 (<http://www.agence-nationale-recherche.fr/>). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Background

Animal African Trypanosomosis particularly affects cattle and dramatically impairs livestock development in sub-Saharan Africa. African Zebu (AFZ) or European taurine breeds usually die of the disease in the absence of treatment, whereas West African taurine breeds (AFT), considered trypanotolerant, are able to control the pathogenic effects of trypanosomosis. Up to now, only one AFT breed, the longhorn N'Dama (NDA), has been largely studied and is considered as the reference trypanotolerant breed. Shorthorn taurine trypanotolerance has never been properly assessed and compared to NDA and AFZ breeds.

Methodology/Principal Findings

This study compared the trypanotolerant/susceptible phenotype of five West African local breeds that differ in their demographic history. Thirty-six individuals belonging to the longhorn taurine NDA breed, two shorthorn taurine Lagune (LAG) and Baoulé (BAO) breeds, the Zebu Fulani (ZFU) and the Borgou (BOR), an admixed breed between AFT and AFZ, were infected by *Trypanosoma congolense* IL1180. All the cattle were genetically characterized using dense SNP markers, and parameters linked to parasitaemia, anaemia and leukocytes were analysed using synthetic variables and mixed models. We showed that LAG, followed by NDA and BAO, displayed the best control of anaemia. ZFU showed the greatest anaemia and the BOR breed had an intermediate value, as expected from its admixed origin. Large differences in leukocyte counts were also observed, with higher leukocytosis for AFT. Nevertheless, no differences in parasitaemia were found, except a tendency to take longer to display detectable parasites in ZFU.

Conclusions

We demonstrated that LAG and BAO are as trypanotolerant as NDA. This study highlights the value of shorthorn taurine breeds, which display strong local adaptation to trypanosomosis. Thanks to further analyses based on comparisons of the genome or transcriptome of the breeds, these results open up the way for better knowledge of host-pathogen interactions and, furthermore, for identifying key biological pathways.

Introduction

Animal African Trypanosomosis (AAT), a neglected tropical disease, particularly affects cattle and dramatically impairs the development of livestock production systems in sub-Saharan Africa [1], [2], [3]. AAT is caused by trypanosomes, blood-borne protozoan parasites from the *Trypanosoma* genus transmitted by haematophagous insects, generally tsetse flies (*Glossina* genus) [4]. According to the Food and Agriculture Organization, they are responsible for the death of 3 million cattle per year, with an annual economic loss estimated at \$1–1.2 billion [5], [6]. No vaccine is available and African livestock breeders annually administer about 35 million curative and preventive treatments, against which certain trypanosome strains have become resistant [7]. Although eradication of tsetse flies has proved possible in a few particular cases [8], it remains impossible in most regions, where integrated control strategies are needed [9].

In this context where AAT remains a dramatic constraint to livestock production, the investigation and optimum utilization of animal genetic resources adapted to harsh environments [10] paves the way for improving AAT control. Indeed, African Zebu breeds (AFZ), as well as European taurine breeds (EUT), are highly susceptible to the disease caused by three tsetse-transmitted trypanosome species, *Trypanosoma congolense*, *T. vivax* and *T. brucei brucei* [11]. Accordingly, breeding susceptible animals is extremely difficult in highly enzootic areas, even when trypanocide drugs are used. Conversely, West Africa taurine breeds (AFT), which are found in humid and sub-humid areas of West Africa where AAT is endemic [12], are considered as able to tolerate the disease, i.e., able to reduce parasitaemia, control anaemia, and remain productive in these areas [13], [14], [15]. West African cattle trypanotolerance would seem to be an adaptive character in response to selective pressure due to trypanosomes. Indeed, the introduction of taurine cattle in West Africa pre-dated the arrival of indicine breeds by at least 3,000 years [16]. However, the trypanotolerant status of AFT in comparison with some AFZ has only been clearly demonstrated under field conditions [17], [18], and during experimental infections [14], [19], [20], [21], [22], [23] for the longhorn taurine N'Dama breed (NDA), which was thus considered as the trypanotolerant reference breed. Conversely, experimental data to assess the degree of trypanotolerance in shorthorn taurine, including in particular Baoulé (BAO), Somba (SOM) and Lagune (LAG), are lacking [24]. The few studies concerning the Baoulé breed under field challenge with *Trypanosoma* sp [25], [26], [27], had the drawback of combining the variability of the host, parasite (at species and strain levels) and tsetse bites, which resulted in a large variability of responses in BAO cattle. Moreover, support for the trypanotolerance of the Lagune breed is based solely on its agro-ecology [24]. A single study based on an experimental infection compared LAG and Borgou (BOR) breeds [28], the latter being a stabilized admixed breed between AFT and AFZ representative of the West African bovine hybrid zone [29], [30], but the study lacked a proper susceptible control breed and used a trypanosome species, *T. brucei brucei*, which is usually less pathogenic than *T. vivax* and *T. congolense* [11].

In this context of the absence of a proper comparison of trypanotolerant traits between the main West African cattle breeds, we sought here to compare for the first time the trypanotolerant/susceptible phenotype of five local West African breeds (LAG, BAO, NDA, ZFU and BOR) during a single experimental infection with *T. congolense*, considered as the main pathogenic trypanosome species for cattle [11], [31], [32]. All the monitored cattle were well characterized at their genome level and the usual parameters, such as parasitaemia, packed cell volume (PCV), and leukocyte counts were analysed using longitudinal data.

Methods

Ethics statement

The experimental protocol was reviewed and approved by the Burkinabe Ethics Committee (Project no. A002-2013 / CE-CM) and it was carried out by qualified and experienced personnel under the supervision of a veterinarian, according to the guidelines of the World Organisation for Animal Health. For trypanosome production, three mice were deeply anaesthetized by a combination of ketamine (at 200 mg/kg) and xylazine (10mg/kg) followed by exsanguination by intra-cardiac puncture. No cattle were euthanized or died during the challenge experiment. Clinical examination was performed each day and when an animal presented a deterioration of its general body condition or suffered signs of severe anaemia (threshold at 15% PCV), it was treated using diminazene aceturate (Veriben, curative treatment) at 7 mg/kg intramuscular, and Fercobsang. The animal continued to be monitored to check for treatment effectiveness and the increase in haematocrit. In any event, all cattle were treated with diminazene aceturate at 7mg/kg at the end of the experiment (133 days post-infection).

Experimental animals

Cattle from five local West African breeds were used for the experiment: eight Baoulé (BAO), eight Borgou (BOR), seven Lagune (LAG), eight N'Dama (NDA) and eight Sudanese Fulani Zebu (ZFU). Unrelated males aged from one to two years and a half were imported to the experimental station from their locations of origin, namely the Lobi region in Burkina Faso for BAO, the Betecoucou and Okpara stations in Benin for BOR, the Samioudji station in Benin for LAG, the Madina Diassa region in Mali for NDA and the Solenzo region in Burkina Faso for ZFU. Location origins are shown in Fig 1. The inclusion criteria were absence of trypanosomes in cattle blood examined according to the parasitological technique of Murray ([33]) and negative serological responses using indirect IgG (immunoglobulin G) antibody ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay) with *T. vivax*, *T. brucei brucei* and *T. congolense* total antigens ([34]), at the time of the veterinary survey.

On their arrival at the CIRDES station, the cattle were kept in a cowshed under mosquito netting, treated with an anthelmintic (Albendazole 2,500 mg Vermitan) *per os*, a combination of ivermectin and clorsulon in SC (0.2 mg and 2mg/kg respectively, Ivomec-D), deltamethrin spray (Vectocid) and a trypanocide drug (diminazene aceturate at 7 mg/kg, Veriben). They were also vaccinated against haemorrhagic septicaemia (Pastovax), contagious bovine pleuropneumonia (Perivax) and blackleg disease (Symptovax). The animals were kept for at least four weeks before being infected.

In order to perform a genetic assignment of each animal to its corresponding breed, the cattle were genotyped using the Illumina BovineSNP50 chip assay v2 [39] at the INRA Labogena platform (Jouy-en-Josas, France) using standard procedures (http://www.illumina.com/products/bovine_snp50_whole-genome_genotyping_kits.ilmn). These new genotypes were combined with those already available [29,39,40]. This dataset included i) 137 AFT individuals from the NDA (ND3), SOM, BAO, and LAG breeds, ii) 138 ZEB individuals from the ZFU,

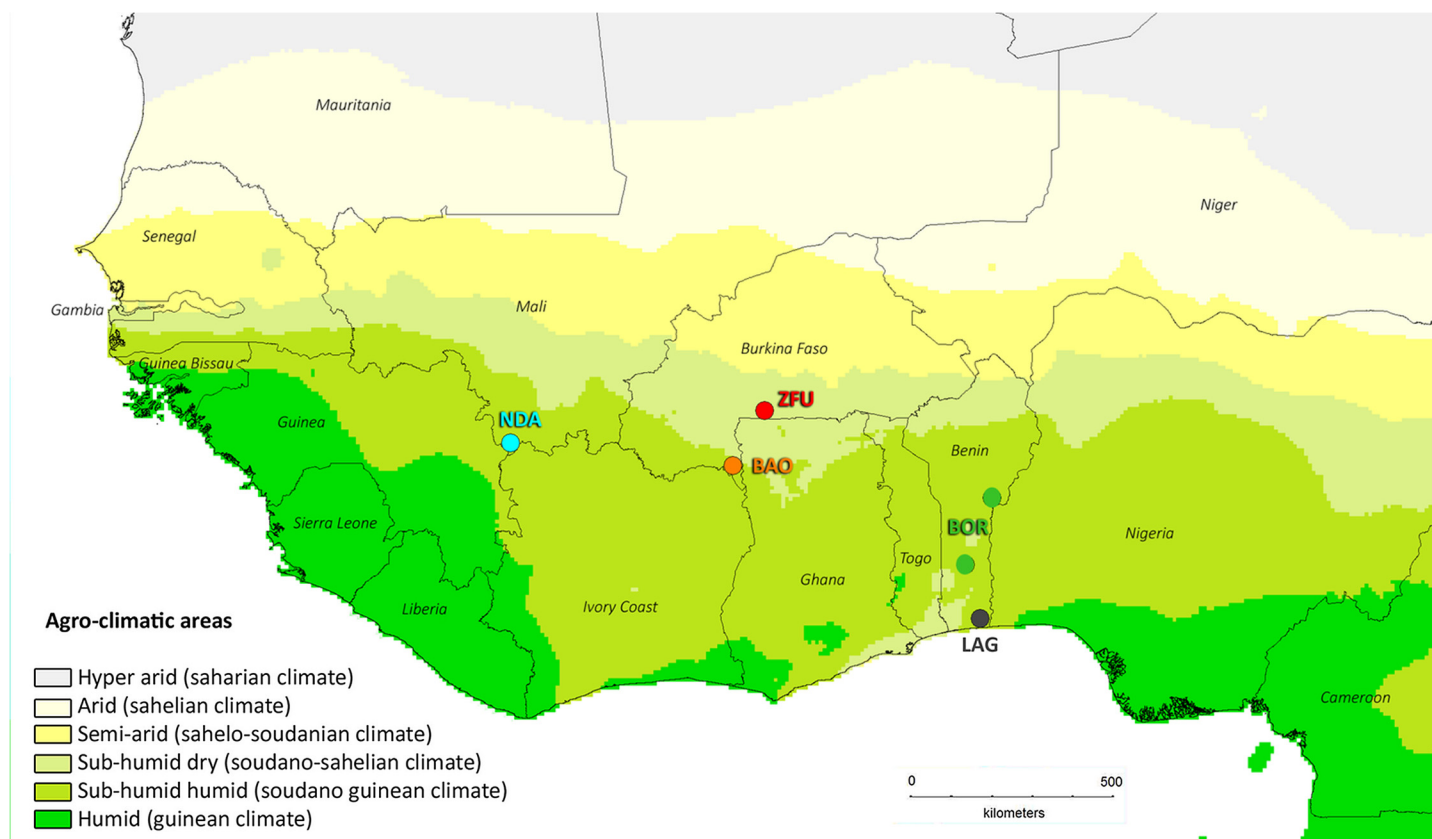


Fig 1. Map representing the geographical origin of the breeds used in the experiment. DIVA-GIS software version 7.5 [35] with the BIOCLIM system [36] was used to obtain the map. The different agro-climatic zones were defined based on the annual precipitation of the Worldclim database (<http://www.worldclim.org>) and according to the OECD 2009 criteria [37]. According to [38], the current northern limit of tsetse presence is slightly above the limit between the semi-arid and sub-humid dry areas. DIVA-GIS and spatial data are freely available and downloadable from <http://www.diva-gis.org/>

doi:10.1371/journal.pone.0126498.g001

Zebu Bororo (ZBO), Zebu from Madagascar (ZMA), Gir (GIR), Nelore (NEL) and Brahman (BRM) breeds, iii) 152 EUT individuals from the Salers (SAL), Limousin (LMS), Holstein (HOL), Montbéliard (MON), Angus (ANG) and Hereford (HFD) breeds, iv) 24 EUTxZEB admixed individuals from the Santa Gertrudis (SGT) breed, v) 26 EUTxAFT admixed individuals from the Oulmes Zaër (OUL) breed and vi) 68 AFTxZEB admixed individuals from the BOR and Kuri (KUR) breeds. Following the procedure described in [40], [30], SNPs that i) displayed a minor allele frequency <0.01 over the whole sample; ii) were genotyped on $<75\%$ of the individuals in at least one breed and iii) did not pass Hardy-Weinberg equilibrium tests, were discarded from the final dataset. A total of 43,845 SNPs genotyped on 545 animals was considered in the analysis. Population structure was analysed through a principal component analysis (PCA), based on individual SNP genotype data with *smartpca* software [41] and visualized using R package *ade4* [42], and through an unsupervised genotype-based hierarchical clustering (UHC) of the individuals using the maximum likelihood method implemented in *Admixture* 1.04 [43].

Trypanosome challenge

The trypanosome used for the challenge was *T. congolense* IL1180, a double clone derivative of Ser/71/STIB/212 [44], [45]. It was chosen because it was isolated from a lion in Tanzania, and thus no cattle could have been infected by this strain before. It has a medium pathogenicity,

allowing the development of a chronic disease [46] and it has been used in previous experiments [21], [22], [47], [48]. The intravenous inoculation route was selected to perfectly control the quantity of injected trypanosomes, which is not possible with tsetse fly inoculation, and in order to avoid cattle immune response interactions with tsetse saliva antigens. Trypanosomes were first multiplied on mice, purified on DEAE cellulose, quantified on Malassez cells and injected at a dose of 10^5 trypanosomes per head of cattle.

Monitoring of phenotypic variables

Several variables were monitored before and during experimental infection. First, blood samples from the jugular vein were collected on EDTA anticoagulant (ethylenediamine tetraacetic acid) five times before infection (days: -25, -11, -7, -3 and -1) and then three times/week during infection, to measure PCV and parasitaemia. PCV was read for each animal in a microhaematocrit tube after centrifugation for 5 min at 12,500 rpm. Parasitaemia was scored according to the phase-contrast buffy coat technique [33], [49] and expressed as the number of trypanosomes/ml.

Erythrocyte and haemoglobin rates (RBC and Hb respectively) were measured -7 and -3 days before infection, every five days on average over the first two months of infection and then every two weeks over the last 2.5 months, using standard procedures with the ABX micro 60 (Horiba). Reticulocytes were sought using brilliant cresyl blue (Merck) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 5 μ l of cattle blood was stained with 5 μ l of saline solution (0.58%) of brilliant cresyl blue (150 mg/l) for 30 min. Blood strains were then performed and examined in immersion after drying with a X100 objective. Reticulocytes were counted among 1,000 RBC. Total white blood cells (TWBC) were counted every four days on average, using direct observation with a Mallassez cell.

Blood in dry tubes was collected once a week to harvest serum for indirect IgG ELISA against total antigens of *T. congolense* [34]. Results were expressed as a percentage of positivity (PP) using three positive and negative reference samples, as already described in [50].

Statistical analyses on synthetic variables

Statistical analyses were carried out with R3.1.0 (R development core team 2007, <http://www.r-project.org/>).

Initially, we used synthetic traits as proposed in [21] and [23] to assess trypanotolerance.

For PCV, RBC and Hb, pre-infection values were the median values recorded before infection, called PCV_Init, RBC_Init and Hb_Init respectively (see Table 1 for the recapitulation of all synthetic variables). The median value (PCV_Med, RBC_Med, Hb_Med) was the median level recorded over the 133 days post trypanosome inoculation. The lowest value (PCV_Min, RBC_Min, Hb_Min) was the absolute lowest level recorded during the course of infection. The maximum decrease (_MD) was the absolute decrease and was calculated as the lowest value minus the pre-infection value. The slope decrease (_SD) was the linear trend in the PCV, RBC or Hb drop and was calculated as the 'Maximum decrease' divided by the number of days the minimum was reached. In addition, the final value (_FI) corresponded to the last recorded value before trypanocide treatment. For TWBC, pre-infection and the median value were similarly calculated. The maximum value (TWBC_Max) was the absolute highest level recorded during the course of infection; the maximum increase (TWBC_MI) was the absolute increase and was calculated as the maximum value minus the pre-infection value. The slope increase (TWBC_SI) was the linear trend in TWBC increase and was calculated as the maximum increase divided by the number of days the maximum was reached. In addition, the final value (TWBC_FI) corresponded to the last recorded value before trypanocide treatment. As regards

Table 1. Meaning and results on synthetic phenotypic variables.

Trait	Variable	Variable code	LAG	NDA	Breed BAO	BOR	ZFU	ks_test	Test	Wilcox
PCV (%)	Pre-infection median	PCV_Init	35.86	34.38	33.80	32.50	37.38	0.083		0.793
			2.79	0.74	3.63	3.16	3.07			
	Median	PCV_Med	30.36	28.63	27.60	26.13	25.50	0.002	*	0.001 **
			1.25	1.41	2.07	2.85	2.27			
	Minimum	PCV_Min	24.86	23.88	22.60	21.75	19.38	0.004	*	0.001 **
			1.46	1.73	2.30	3.28	2.45			
	Maximum decrease	PCV_MD	-11.00	-10.50	-11.20	-10.75	-18.00	0.010	*	0.003 *
			2.31	2.00	4.32	2.60	4.63			
	Slope decrease	PCV_SD	-0.13	-0.21	-0.18	-0.19	-0.32	0.003	*	0.001 **
			0.02	0.07	0.07	0.07	0.11			
	Final value	PCV_FI	31.86	31.00	30.20	29.13	24.88	0.048		0.007 *
			2.67	2.07	3.27	3.23	5.99			
	Final—init	PCV_FI-Init	-4.00	-3.38	-3.60	-3.38	-12.50	0.033		0.016 *
			4.55	2.07	2.70	3.07	7.48			
PA (/ml)	Mean [$\log_{10}(\text{PA}+1)$]	PA_Mean	1.88	2.01	2.17	1.67	2.16	0.425		0.060
			0.22	0.46	0.48	0.94	0.88			
	Rate of positive observation	PA_Obs	0.51	0.53	0.60	0.44	0.55	0.342		0.059
			0.06	0.11	0.11	0.24	0.21			
	Frist day of positive sample	PA_First	16.00	15.75	15.60	15.38	17.13	0.744		0.362
			2.08	3.96	3.05	2.50	2.64			
	Maximum value [$\log_{10}(\text{PA}+1)$]	PA_Max	5.09	5.14	4.96	4.73	5.26	0.750		0.202
Hb (g/dl)	Pre-infection median	Hb_Init	12.45	11.51	11.47	11.11	12.78	0.021		0.757
			0.94	0.36	0.94	0.93	1.16			
	Median	Hb_Med	10.05	9.37	9.08	8.51	8.33	0.001	**	0.001 **
			0.48	0.43	0.47	0.83	0.80			
	Minimum	Hb_Min	8.03	7.61	6.88	7.03	6.33	0.035		0.004 *
			0.92	0.85	1.03	1.33	1.08			
	Maximum decrease	Hb_MD	-4.42	-3.89	-4.59	-4.08	-6.45	0.002	*	0.002 *
			1.07	0.96	0.67	1.08	0.95			
	Slope decrease	Hb_SD	-0.08	-0.06	-0.07	-0.10	-0.11	0.038		0.060
			0.03	0.02	0.03	0.06	0.03			
	Final value	Hb_FI	10.31	9.85	9.64	9.49	7.75	0.021		0.005 *
			0.51	0.62	1.00	0.96	1.79			
	Final—init	Hb_FI-Init	-2.14	-1.66	-1.83	-1.63	-5.03	0.001	**	0.002 *
			0.77	0.49	0.67	0.78	1.86			
RBC ($\times 10^9/\text{ml}$)	Pre-infection median	RBC_Init	8.56	8.17	8.28	7.67	9.30	0.004	*	0.964
			0.83	0.37	0.58	0.82	0.61			
	Median	RBC_Med	7.16	6.81	6.69	5.82	6.36	0.010	*	0.020
			0.55	0.79	0.38	0.73	0.60			
	Minimum	RBC_Min	5.82	5.37	4.98	4.53	4.38	0.043		0.014
			0.76	0.87	0.50	0.99	1.20			
	Maximum decrease	RBC_MD	-2.74	-2.80	-3.30	-3.13	-4.93	0.002	*	0.000 **
			0.92	0.77	0.69	0.77	1.00			
	Slope decrease	RBC_SD	-0.05	-0.05	-0.04	-0.05	-0.09	0.046		0.014
			0.02	0.02	0.02	0.01	0.04			

(Continued)

Table 1. (Continued)

Trait	Variable	Variable code	LAG	NDA	Breed BAO	BOR	ZFU	ks_test	Test	Wilcox
	Final value	RBC_FI	8.01	7.34	7.30	6.40	5.44	0.018		0.007 *
			1.17	1.25	0.52	0.97	1.53			
	Final—init	RBC_FI-Init	-0.55	-0.83	-0.98	-1.26	-3.86	0.001	**	0.000 **
			1.41	1.07	0.81	0.87	1.48			
TWBC (x10 ⁶ /ml)	Pre-infection median	TWBC_Init	6.43	6.26	7.42	6.70	6.70	0.167		0.699
			0.88	0.39	0.93	0.79	0.91			
	Median	TWBC_Med	13.81	12.31	11.70	9.96	8.99	0.001	**	0.000 **
			2.00	2.23	1.33	2.06	1.64			
	Maximum	TWBC_Max	18.27	17.80	16.82	15.09	13.23	0.009	*	0.003 *
			2.78	2.99	2.42	2.45	2.32			
	Maximum increase	TWBC_MI	11.84	11.54	9.40	8.39	6.53	0.010	*	0.002 *
			2.03	3.11	3.12	2.84	2.83			
	Slope increase	TWBC_SI	0.14	0.12	0.09	0.11	0.09	0.143		0.036
			0.06	0.03	0.02	0.06	0.04			
	Final value	TWBC_FI	16.96	15.21	15.02	13.26	10.63	0.020		0.000 **
			3.02	3.71	2.51	2.97	3.34			
	Final—init	TWBC_FI-Init	10.53	8.95	7.60	6.56	3.93	0.025		0.000 **
			2.27	3.76	3.27	3.22	3.67			

For each breed, the average for the individuals is noted, with its standard deviation below. *P*-values for the non-parametric Kruskal-Wallis tests (ks_test) on the 5 breeds and for the Wilcoxon tests (wilcox) comparing LAG and ZFU (LAG>ZFU hypothesis except PA) are shown.

Symbols:

“*” *P*-values ≤ 0.01

“**” *P*-values ≤ 0.001

doi:10.1371/journal.pone.0126498.t001

parasitaemia, the average parasitaemia value (PA_Mean) was calculated as the average of the log₁₀(parasitaemia + 1) during the course of infection. The maximum parasitaemia (PA_Max) was also noted, as well as the first day post infection (PA_First) that an animal was detected as being parasitaemic for the first time. Finally, the proportion of times an animal was detected as parasitaemic was also recorded (PA_Obs).

The breed effect was assessed for these synthetic variables using the non-parametric Kruskal-Wallis test (for a comparison of all breeds) and the one-sided hypothesis Wilcoxon test for the LAG-ZFU comparison, and a comparison of variances was performed using the non-parametric Fligner-Killeen test. A Spearman rank correlation test was performed between a subset of 20 variables, four for each five traits, PCV, PA, Hb, RBC and TWBC (displayed in Table 2) to avoid redundant variables. A principal components analysis (PCA) was carried out on the same 20 variables using the Ade4 R package [42].

Statistical analyses on longitudinal data

Then, to benefit from the repeated measure taken on each head of cattle for 5 months we performed mixed linear models that accounted for intra-correlation measurements for each animal and assessed the breed effect. PCV and TWBC could be modelled as Gaussian variables using the NLME R package [51].

Firstly, PCV was the response variable, the animal was considered as a random effect, and the breed and days post infection (DPI) were fixed effects, possibly with interactions. Following

Table 2. Results of the linear mixed effects model on PCV.

Fixed effects	Estimate	S.E.	p-value	
Intercept (LAG)	33.30	1.14	0.00000	***
DPI (LAG)	-0.04	0.05	0.43270	
DPI ² (LAG)	-0.0010	0.0007	0.12770	
DPI ³ (LAG)	0.00001	0.00000	0.00100	**
BAO	-0.64	1.76	0.71930	
BOR	-2.85	1.54	0.07360	
NDA	0.92	1.54	0.55370	
ZFU	1.37	1.57	0.38960	
DPI:BreedBAO	-0.12	0.08	0.14310	
DPI:BreedBOR	-0.15	0.07	0.03360	*
DPI:BreedNDA	-0.17	0.07	0.01600	*
DPI:BreedZFU	-0.35	0.07	0.00000	***
DPI ² :BreedBAO	0.0019	0.0010	0.05920	
DPI ² :BreedBOR	0.0028	0.0008	0.00090	***
DPI ² :BreedNDA	0.0026	0.0008	0.00230	**
DPI ² :BreedZFU	0.0053	0.0009	0.00000	***
DPI ³ :BreedBAO	-0.00001	0.00000	0.05490	
DPI ³ :BreedBOR	-0.00001	0.00000	0.00030	***
DPI ³ :BreedNDA	-0.00001	0.00000	0.00340	**
DPI ³ :BreedZFU	-0.00002	0.00000	0.00000	***

For the different fixed effects, estimates, standard errors (S.E.) and associated *P*-values are indicated. LAG was the reference breed so the intercept and DPI values are estimated for this breed.

Symbols:

“*” *P*-values ≤ 0.05

“**” *P*-values ≤ 0.01

“***” *P*-values ≤ 0.001

doi:10.1371/journal.pone.0126498.t002

the recommendations made in [52], several models were tested using a Maximum Likelihood (ML) algorithm and the one which seemed to best fit the data was computed using REML (Restricted Maximum Likelihood). Random effects were compared using likelihood ratio tests and fixed effects were chosen according to an individual *t*-test and single model Anova (F-test). Diagnostic plots were edited to check model assumptions.

The final model for PCV was:

$$PCV_{ijk} = \mu + B_i \times (t_j + t_j^2 + t_j^3) + a_k \times (t_j + t_j^2) + \varepsilon_{ijk} \quad (1)$$

where PCV_{ijk} was the PCV of an animal *k* from breed *i* on t_j , with a_k representing the animal ($k = 1, \dots, 36$), B ($j = 1, \dots, 5$) the breed, and *t* the time after infection as numeric (63 dates in total, from 0 to 133 DPI). The PCV values at $t = 0$ were calculated as the median of the five pre-infection values. Within-animal errors ε_{ijk} followed a Gaussian distribution $N(0, \sigma^2 \delta_{Bi}^2)$, allowing the modelling of heteroscedasticity among breeds (δ_{Bi}^2), and autocorrelation within animal errors ($\text{cor}(\varepsilon_{kj}, \varepsilon_{kj'})$) was modelled with an autoregressive model AR(1). Random effects were also normally distributed and $a_k \sim N(0, \psi)$, where ψ was the symmetric variance-covariance matrix of size (3 x 3), with variances of the three random effects on the diagonal and their co-variances outside the diagonal.

After graphical observations, TWBC was modelled according to an asymptotic regression model computed in the *nlme* R package [51], which followed the standard equation:

$$y(x) = \phi_1 + (\phi_2 - \phi_1) \times \exp[-\exp(\phi_3)x] \quad (2)$$

so that ϕ_1 is the asymptote as $x \rightarrow \infty$, ϕ_2 is $y(0)$ and ϕ_3 is the logarithm of the rate constant. Applied to TWBC, this equation became:

$$WC_{ijk} = (\phi_1 + B_{1i} + a_{1k}) + [(\phi_2 + B_{2i}) - (\phi_1 + B_{1i} + a_{1k})] \times \exp[-\exp(\phi_3 + a_{3k})t_j] + \varepsilon_{ijk} \quad (3)$$

where WC_{ijk} was the TWBC of an animal k from breed i on t_j , B_{1i} and B_{2i} were the breed fixed effects, and a_{1k} and a_{2k} were the animal random effects. Within-animal errors ε_{ijk} followed a Gaussian distribution $N(0, \sigma^2 \delta^2_{Bi})$, allowing modelling of the heteroscedasticity among breeds, and autocorrelation within animal errors ($\text{cor}(\varepsilon_{kj}, \varepsilon_{kj'})$) was modelled with an autoregressive model AR(1); and $a_k \sim N(0, \Psi)$, where Ψ was the symmetric variance-covariance matrix of size (2×2) , with variances of the two random effects on the diagonal and their co-variances outside the diagonal.

Parasitaemia dynamics can be investigated working either with a Bernoulli variable (0 = non-parasitaemic; 1 = parasitaemic) or with a quantitative variable to try inferring the level of parasitaemia. We used the glmmADMB R package [53], which offers flexible ways of running mixed models for non-Gaussian variables. Firstly, we modelled parasitaemia as a simple Bernoulli variable, using a binomial distribution with a logit link:

$$\text{logit}(\mu_{ijk}) = \log\left(\frac{\Pr(Y_{ijk}=1)}{\Pr(Y_{ijk}=0)}\right)$$

$$\text{logit}(\mu_{ijk}) = \mu + B_i \times t_j + t_j^2 + t_j^3 + t_j^4 + t_j^5 + a_k \times t_j + \varepsilon_{ijk} \quad (4)$$

where μ_{ijk} was the probability of a head of cattle a_k being positive for parasitaemia, B_i the breed effect, t_j the time, ε_{ijk} the residuals, and a_k the random animal effect.

Secondly, the parasitaemia level was investigated as count data provided by buffy coat observations. This variable displayed strong over-dispersion. Thus a negative binomial, instead of a Poisson distribution, was used to cope with over-dispersion with $\text{Var}(X) = E(X) \times (1 + E(X) / \alpha)$. The model was:

$$PA_{ijk} = \mu + t_j + t_j^2 + t_j^3 + t_j^4 + t_j^5 + a_k \times t_j + \varepsilon_{ijk} \quad (5)$$

where PA_{ijk} was the count of parasites for a head of cattle a_k , t_j the time, ε_{ijk} the residuals, and a_k the random animal effect.

Results

Genetic assignment of the experimental cattle to local breeds

The individual-based PCA (S1 Fig) revealed that newly sampled individuals (namely NDAa, BAOa, LAGa, BORa and ZFUa populations in the supplementary data) were located as expected near individuals of their reference breed previously genetically characterized, except for two BAOa individuals which were close to the BOR breed. These results were confirmed by the unsupervised hierarchical clustering analysis with $k = 3$ clusters (S1 Fig and S1 Table). Only the two BAOa individuals identified by PCA presented a higher level of ZEB ancestry (0.19 and 0.28, respectively) than individuals from the BAO breed (0.01 on average). These animals, erroneously assigned to BAO according to their phenotypic characteristics, were discarded from the further analyses.

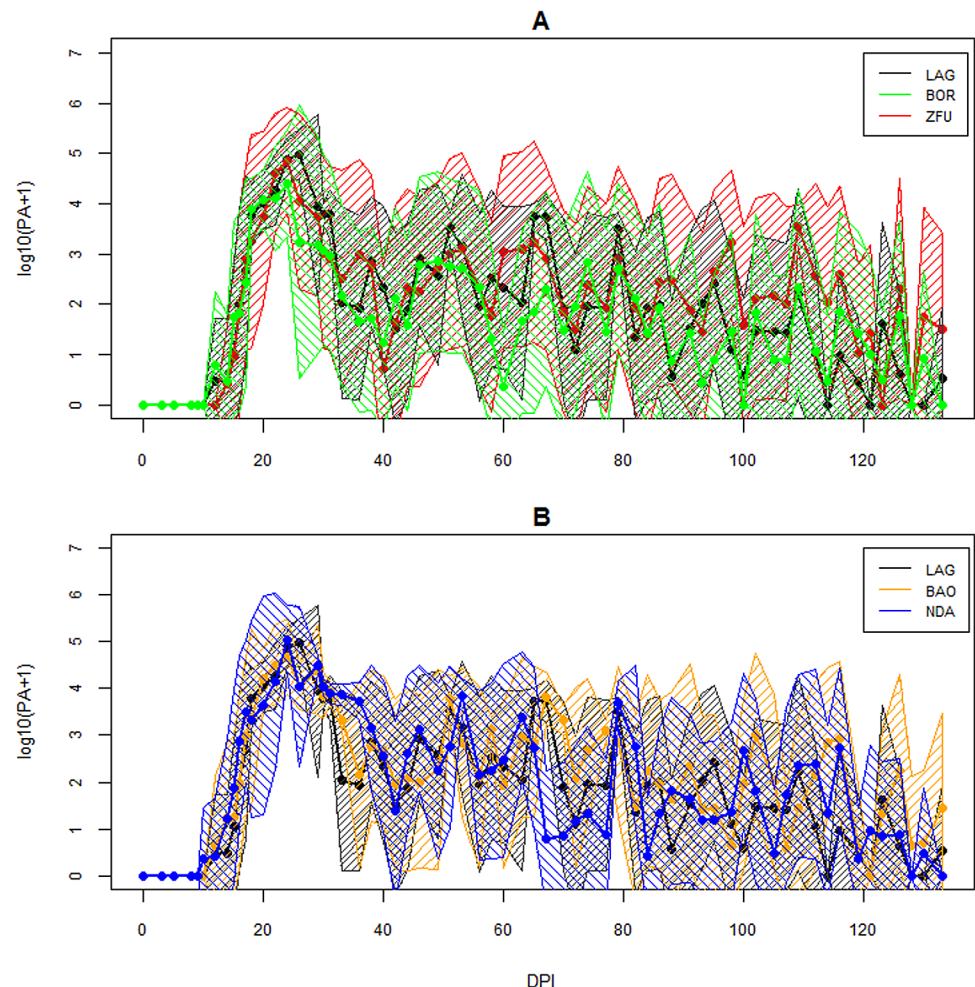


Fig 2. Evolution of parasitaemia over the time course of infection. For visual convenience, the five breeds are presented in two graphical devices, with LAG used as the reference population. PA is estimated as the number of trypanosomes/ml of blood. A. log₁₀(PA+1) evolution for the LAG, ZFU and BOR breeds. B. log₁₀(PA+1) evolution for the LAG, NDA and BAO breeds. The continuous lines are the average per breed and the surrounding areas represent more and less one standard deviation from the mean.

doi:10.1371/journal.pone.0126498.g002

Infection development

Phenotypic data from 36 cattle, five BAO, eight BOR, seven LAG, eight NDA and eight ZFU, were then studied. In fact, one Baoulé displaying trypanosomes in the blood on the day of its arrival at CIRDES before the experiment was treated and removed from the phenotypic analyses. The raw phenotypic data are presented in [S2 Table](#).

As the PCV of one ZFU dropped to 15% at 95 DPI, that individual was treated with acetate diminazene and this date was considered as its last observation. The infection followed a classic course, as expected for inoculation with *T. congolense* IL1180. The changes in parasitaemia, PCV and TWBC are displayed in [Figs 2–4](#). Parasites were detected in the blood between 10 and 24 DPI. Generally, peaks were reached between 20 and 30 DPI and then parasitaemia waves were observed. PCV dropped more or less depending on the cattle and minima were reached between 26 and 109 DPI, and increased slowly after that, except for two ZFU whose PCV decreased until treatment. Hb and RBC followed the same dynamics as PCV (data not shown). TWBC increased globally, but a strong variation between breeds was observed. PP

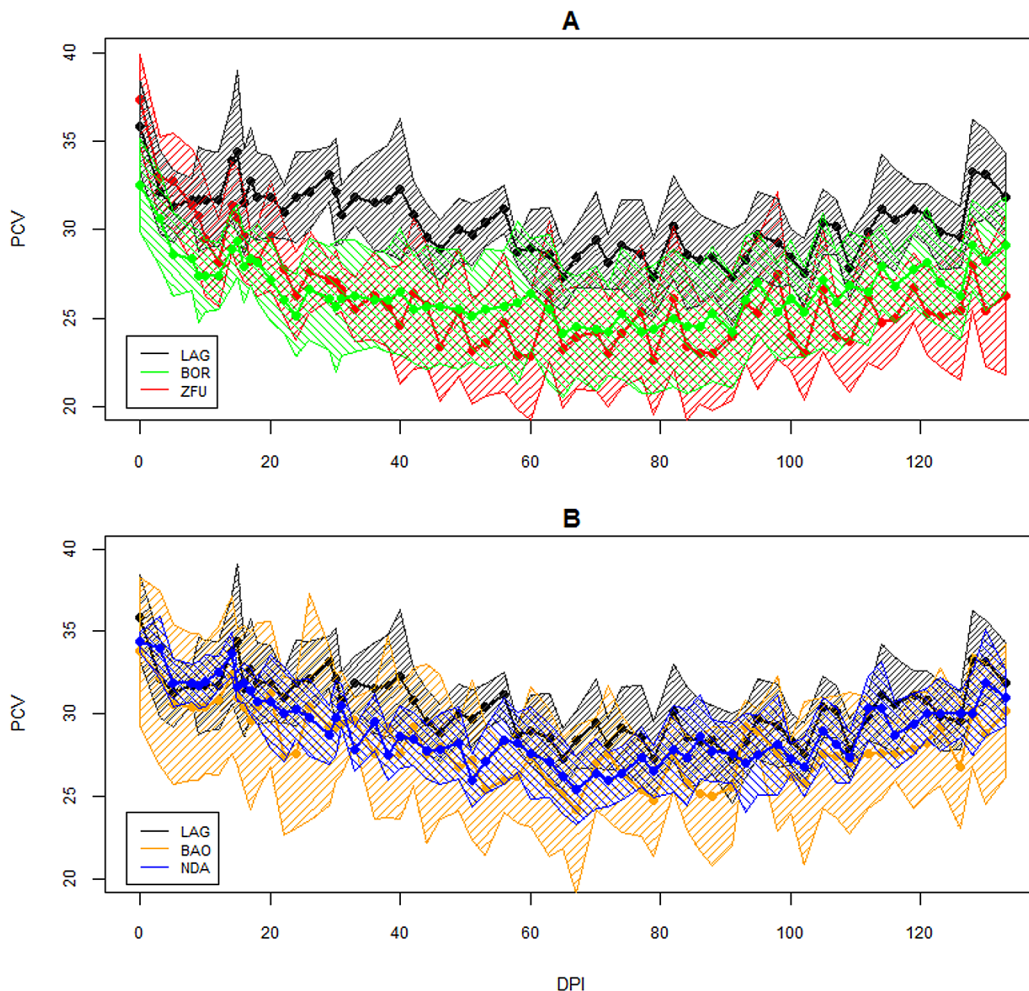


Fig 3. Evolution of PCV over the time course of infection. PCV is expressed as a percentage of blood volume. A. PCV evolution for the LAG, ZFU and BOR breeds. B. PCV evolution for the LAG, NDA and BAO breeds. The continuous lines are the average per breed and the surrounding areas represent the confidence intervals of the means at 95%.

doi:10.1371/journal.pone.0126498.g003

increased around 20 DPI, except for two BOR (BOR5 and BOR8) and two ZFU (ZFU4 and ZFU7), whose values remained low during the course of infection (see Fig 5). No reticulocyte was detected during the experiment in any animals.

The results on synthetic variables highlighted differences in anaemia-related traits and TWBC

Synthetic variables, related to PCV, Hb, RBC, TWBC and PA, were used to assess inter-breed variability and study correlations (see Table 1). PP was not studied as a quantitative variable, since the linearity of PP responses in relation to antibody concentration has not been validated with the method proposed by [50] and [34].

The means and standard deviations per breed for 32 indicators are presented in Table 1, with the *P*-values of the Kruskal-Wallis and Wilcoxon tests. Pre-infection values for PCV, Hb and TWBC were not significantly different between breeds; only initial values for RBC were different (*P*-value = 0.005), with a larger value for ZFU.

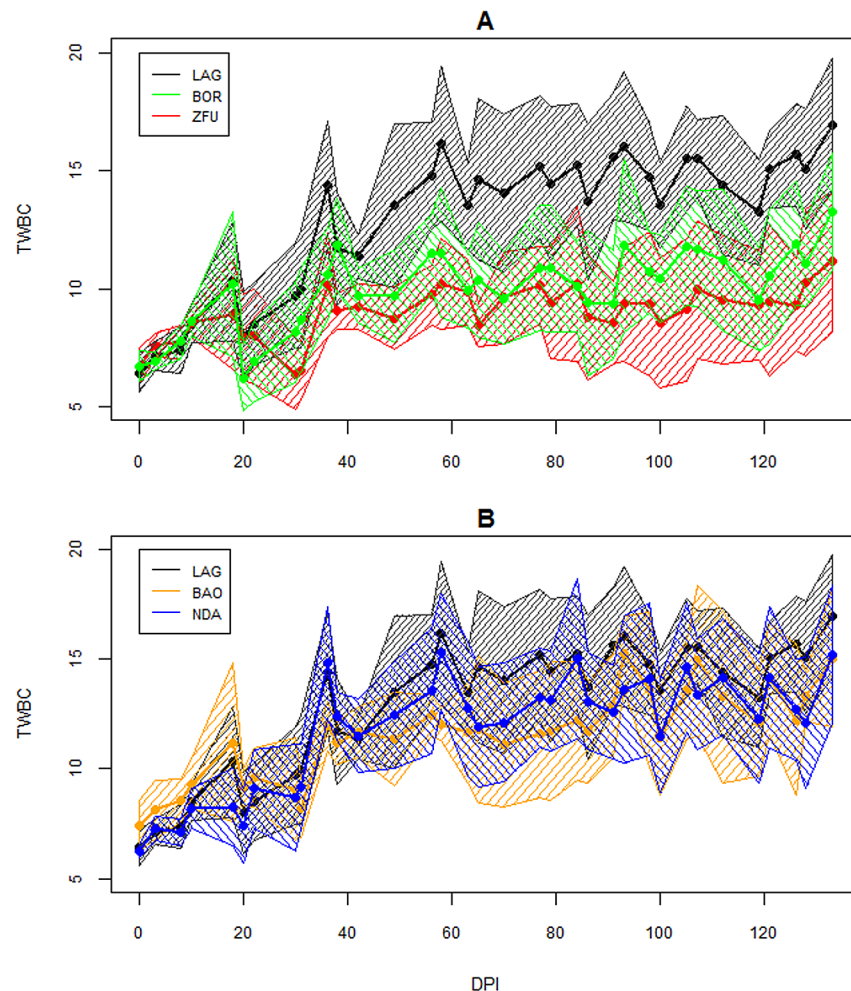


Fig 4. Evolution of TWBC over the time course of infection. TWBC is expressed as million leukocytes/ml of blood. A. TWBC evolution for the LAG, ZFU and BOR breeds. B. TWBC evolution for the LAG, NDA and BAO breeds. The continuous lines are the average per breed and the surrounding areas represent the confidence intervals of the means at 95%.

doi:10.1371/journal.pone.0126498.g004

The anaemia indicators (PCV_Med, PCV_Min, PCV_MD, PCV_SD, Hb_Med, Hb_MD, Hb_FI-Init, RBC_Med, RBC_MD, RBC_FI-Init) were significantly different between breeds, with usually the best values for LAG, followed by NDA, BAO, BOR and the worst ones for ZFU. In addition, when comparing only LAG and ZFU, the final values for PCV, Hb and RBC before treatment were significantly higher in LAG than in ZFU. The parasitaemia indicators did not significantly differ between breeds. The TWBC indicators were significantly different (TWBC_Med, _Max, _MI) and were highest for LAG, followed by NDA, BAO, BOR, and lastly by ZFU.

The PCA results are displayed in Fig 6. Axis 1 of the PCA represents anaemia indicators during infection, axis 2 PCV, Hb and RBC pre-infection values and axis 3 parasitaemia (average, maximum value and percentage of positive values). The correlation circles showed information identical to the correlation coefficients estimated between the variables and their associated *P*-values, which are shown in S3 Table. The anaemia indicators, based on PCV, RBC and Hb, were highly correlated, especially the median, maximum decrease and last values between them. They were not correlated to the pre-infection variables, except for the maximum

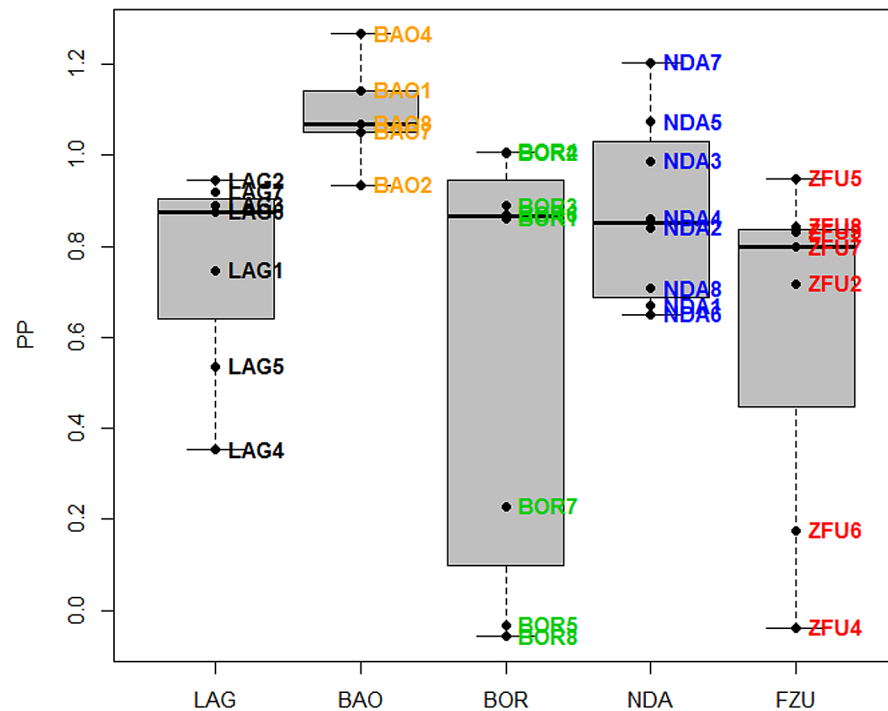


Fig 5. PP on IgG directed against trypanosome antigens at the end of the experiment depending on the breed. Boxplot representing PP for the five breeds at DPI = 133, with the cattle codes.

doi:10.1371/journal.pone.0126498.g005

decrease indicators (MDs), which were linked to the initial values by construction. The parasitaemia indicators (average level and percentage of positive values) were significantly correlated to the anaemia indicators and, in particular, negatively correlated with median PCV during infection ($\rho = -0.56$, $P = 4.10^{-4}$). The TWBC indicators were correlated with each other during infection (and not with pre-infection values) and were positively associated with PCV, Hb and RBC (i.e. median TWBC and median PCV: $\rho = 0.59$, $P = 10^{-4}$) but they were not correlated to parasitaemia.

When positioning individuals on the factorial planes, we found that the ZFU animals were mainly on the right-hand side of Axis 1, highlighting their greatest anaemia; LAG and NDA were found on the left-hand side of the axis (least anaemia), and BAO and BOR between them, with a high dispersion for BOR. Two BOR individuals (BOR3 and BOR7) drew axis 2 with lower PCV, Hb and RBC pre-infection values. On Axis 3, no trend by breed was found, but two ZFU, two BOR and one NDA drew this axis. These animals displayed a lower average parasitaemia and percentage of positive samples, especially the two BOR (BOR5 and BOR8), which displayed only 4 and 5 dates with detectable parasites during the experiment. Such intra-breed variability has been reported in different breeds, BAO and ZFU [25], [26], [54], in East African zebu [55] and in N'Dama [56].

Longitudinal analyses of PCV, TWBC and parasitaemia

PCV was modelled during the course of infection according to a degree 3 polynomial in order to capture its decrease and its recovery [19]. The model (1) result can be found in Table 2. LAG was used as the reference breed as a contrast. LAG seemed mildly affected by the infection, since coefficients on DPI and DPI² were negative but not significantly different from zero; the coefficient on DPI³ was slightly positive and significant. For the other breeds, the coefficients

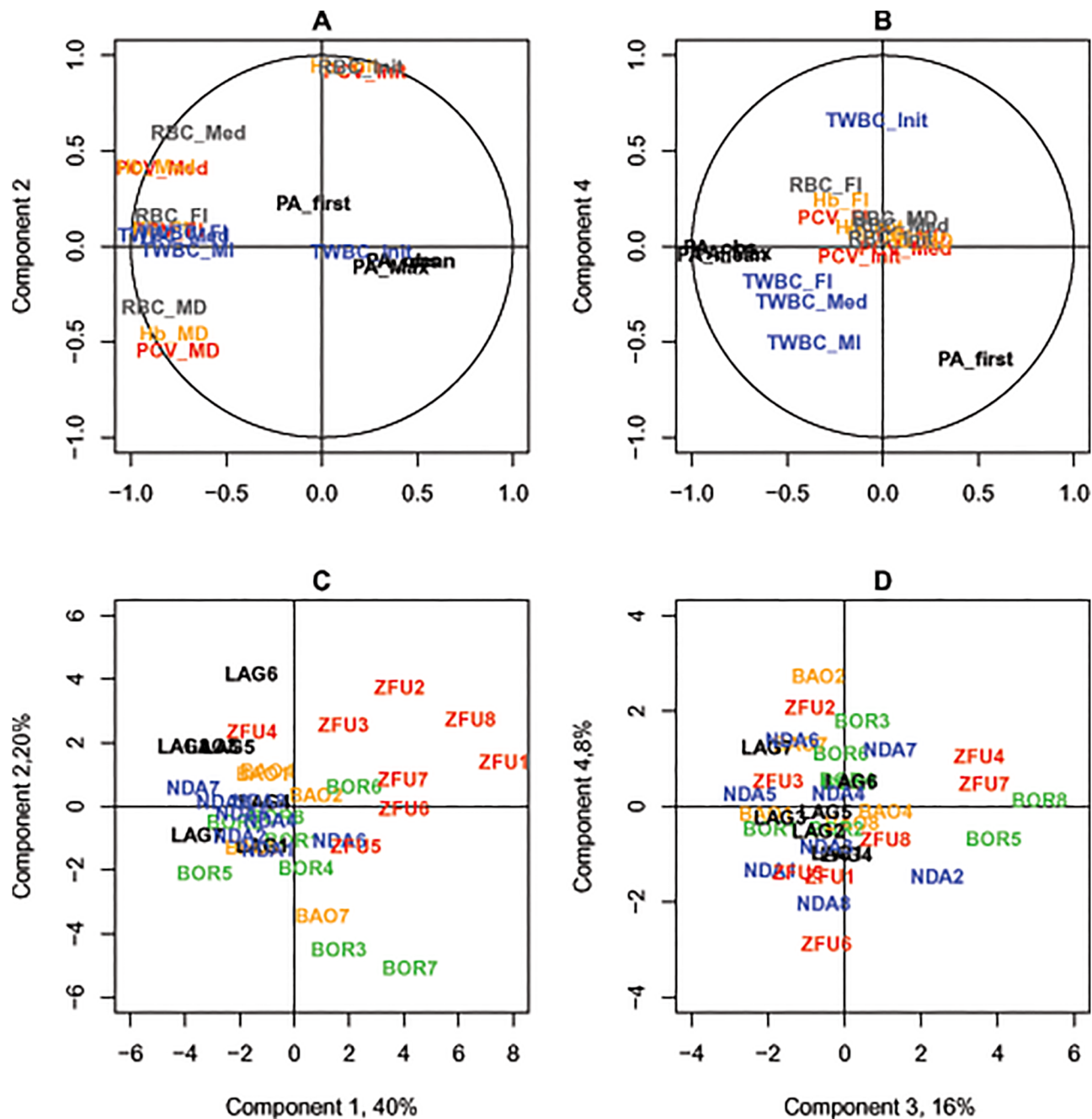


Fig 6. PCA analyses of synthetic variables. A. Correlation circle of the variables used for the PCA, projected on the first two components. B. Correlation circle of the variables used for the PCA, projected on the third and fourth components. PCV-related traits are presented in red, RBC in grey, Hb in orange, TWBC in blue and PA in black. The codes are explained in Table 1. C. Projection of individual coordinates on axes 1 and 2. D. Projection of individual coordinates on axes 3 and 4. Breed colours for LAG, BAO, NDA, BOR and ZFU are respectively black, orange, blue, green and red.

doi:10.1371/journal.pone.0126498.g006

on the intercept were not significantly different from zero, meaning there was no significant breed difference on pre-infection PCV. On the other hand, numerous interactions between DPI and the breed were significant, especially the strongly negative interaction between DPI*ZFU, highlighting the greater drop in PCV in ZFU in comparison to LAG, with an estimate $I(\text{DPI} \times \text{ZFU}) = -0.35$. Negative and slightly significant interactions, DPI*NDA and

Table 3. Results of the non-linear mixed effects model on TWBC.

Fixed effects	Estimate	S.E.	P-value	
Φ_1 (LAG)	15.8460	0.9197	0.0000	***
Φ_1 :BreedBAO	-2.6275	1.3490	0.0517	
Φ_1 :BreedBOR	-4.3733	1.2117	0.0003	***
Φ_1 :BreedNDA	-1.5012	1.1938	0.2088	
Φ_1 :BreedZFU	-6.2201	1.2304	0.0000	***
Φ_2 :(LAG)	5.6983	0.5167	0.0000	***
Φ_2 :BreedBAO	1.6068	0.6711	0.0168	*
Φ_2 :BreedBOR	0.8543	0.6477	0.1875	
Φ_2 :BreedNDA	0.2475	0.6813	0.7165	
Φ_2 :BreedZFU	1.4240	0.6219	0.0222	*
Φ_3	-3.6259	0.1103	0.0000	***

Estimates, standard errors (S.E.) and associated *P*-values are indicated for the non-linear coefficients Φ_1 (asymptote), Φ_2 (starting value) and Φ_3 (rate constant) and interactions with breeds.

Symbols:

“*” *P*-values ≤ 0.05

“**” *P*-values ≤ 0.01

“***” *P*-values ≤ 0.001

doi:10.1371/journal.pone.0126498.t003

DPI*BOR, were also noticed. To allow recovery, positive interactions between DPI² existed for these breeds, compensated for by a negative interaction with DPI³. The adjusted BAO estimates were not significantly different from LAG.

For almost all the cattle, TWBC increased immediately after infection and capped at a maximum value, and it was thus modelled by an asymptotic function (model 3) whose results are in Table 3. The initial value estimate was 5.7×10^6 TWBC/ml (S.E. = 0.5) for LAG, its asymptotic estimate was 15.8×10^6 TWBC/ml (S.E. = 0.9) and its logarithm rate constant was -3.6 (S.E. = 0.1). The initial values for BAO and ZFU were slightly and significantly larger than for LAG. Interestingly, the asymptotic estimates for BOR and ZFU were significantly lower than for LAG, with a decrease of -4.4 (S.E. = 1.2, $P = 3.10^{-4}$) and -6.2 (S.E. = 1.2, $P < 10^{-4}$) for these breeds, respectively, in comparison with LAG. The NDA and BAO asymptotic estimates were not different from the LAG estimate.

The probability of being positive for parasitaemia was investigated according to model (4) and the result is shown in Table 4. The different degrees of the time polynomial were highly significant, to fit the wave form of the probability of positive parasitaemia. Interestingly, a positive and significant interaction was found between DPI and the ZFU breed (estimate = 0.0196, $P = 0.002$), showing a trend of ZFU cattle to remain positive for parasitaemia longer than LAG cattle. For instance, the odds ratio of ZFU/LAG was estimated at 2.1 at 100 DPI. The other breeds did not show any parameters significantly different from LAG. No breed effect was highlighted on the parasite count (model 5).

Discussion

This study set out to investigate trypanotolerance traits in five West African local breeds, including three breeds, LAG, BAO and BOR, that had yet to be extensively studied.

Studying PCV, which is considered as a good indicator for simply assessing trypanotolerance as anaemia is the main pathogenic feature of infection by *T. congolense* and is correlated

Table 4. Results of the generalized linear mixed effects model on parasitaemia.

Fixed effects	Estimate	S.E.	P-value	
Intercept (LAG)	-12.2000	1.1200	2.00E-16	***
DPI (LAG)	1.3600	0.1180	2.00E-16	***
BAO	0.0161	0.6960	0.9815	
BOR	-0.5350	0.6200	0.3881	
NDA	0.0698	0.6150	0.9096	
ZFU	-1.2000	0.6150	0.0512	.
DPI ² (LAG)	-0.0448	0.0044	2.00E-16	***
DPI ³ (LAG)	0.0006	0.0001	2.00E-16	***
DPI ⁴ (LAG)	-0.000004	0.0000	3.40E-15	***
DPI ⁵ (LAG)	0.00000001	0.0000	2.90E-12	***
DPI:BreedBAO	0.0073	0.0071	0.3075	
DPI:BreedBOR	-0.0011	0.0067	0.8708	
DPI:BreedNDA	0.0006	0.0064	0.9268	
DPI:BreedZFU	0.0196	0.0064	0.0024	**

Estimates, standard errors (S.E.) and associated *P*-values are indicated for the different fixed effects.

Symbols:

“*” *P*-values ≤ 0.05

“**” *P*-values ≤ 0.01

“***” *P*-values ≤ 0.001

doi:10.1371/journal.pone.0126498.t004

to growth [23], [19], [57], and to reproductive performances [58], we first confirmed the trypanosusceptibility status of ZFU and the trypanotolerant status of NDA.

Interestingly, under our experimental conditions, our experiment also showed that short-horn taurines, the LAG and BAO breeds, are as trypanotolerant as the longhorn NDA. Indeed, shorthorn taurines controlled PCV remarkably well, as exemplified by LAG, which displayed the best anaemia control indicators. Depending on breed history and agroecology, the strong trypanotolerance of LAG is not surprising, since this breed inhabits a region under a Sudano-Guinean climate infested by several tsetse species from the *morsitans*, *palpalis* and *fuscus* groups [59], [60], and has thus been under strong selective pressure for hundreds of generations. BOR, as expected according to its admixed origin between ZFU and shorthorn taurine and its breeding conditions in a sub-humid area [30], displayed intermediate trypanotolerance between AFT and AFZ. To qualify in our comparisons between LAG and NDA, the infected NDA cattle originated from Madina-Diassa in Mali, and not from Fouta-Djallon in Guinea, which is assumed to be the cradle of the breed [12]. Genetic differentiation was reported between NDA from Guinea and Mali, with the latter having some alleles of indicine origin [40]. Thus NDA from Guinea might be more trypanotolerant than NDA from Mali, and would deserve to be better characterized at phenotypic level.

No reticulocytes were detected in our experiment, whereas they were observed by [61] with large variations between breeds. Reticulocytes, which are normally not present in ruminant blood, appeared late during anaemia and their absence prevented any conclusion as to the status of the anaemia (regenerative or not, [62]). Here, anaemia was not very pronounced and maybe not sufficient to induce a detectable occurrence of reticulocytes in blood.

The parasitaemia results were less conclusive than those for PCV. No comparison using synthetic variables was significant, but according to the linear mixed model based on the longitudinal data, ZFU harboured detectable parasites longer than LAG, whereas differences in the

parasitaemia scores were not found. Our results correspond to those described in [19], which did not highlight differences in either the prepatent period or in the first parasitaemia waves between NDA and the Boran Zebu, but more persistent infection was found in the Boran during primo-infection.

Although most of the parasitaemia indicators were not significantly different between breeds, we found a significant negative phenotypic correlation between median PCV during infection and parasitaemia. Such correlations have already been observed in several studies [19], [63], [23], [21] but with different magnitudes depending on the variable calculation, the cattle populations or the experimental conditions. It is obvious that parasite infection is the primary cause of anaemia, but the intensity of the latter is not a simple function of parasite burdens: it depends on interacting mechanisms, including host-inflammatory-mediated anaemia and parasite-induced anaemia [64], more or less buffered by the erythropoietic response [65] or the cell-membrane composition of RBC [66]. Thereby, some QTL were associated with both PCV and the parasitaemia indicators, whereas others were independently linked to one or the other [21]. Moreover, using an experiment with NDA, the Boran Zebu and twins sharing haematopoietic chimaerism, [22] concluded that parasitaemia control and PCV maintenance were due to independent physiological mechanisms, the first one being not linked to the haematopoiesis cells line alone, and the second one depending on hematopoietic stem cells.

Leukocytosis was found in the different breeds, but with significant differences in amplitude between breed types, as ceiling values were maximal for LAG, NDA and BAO, followed by BOR, then ZFU. Lymphocytosis has been reported in NDA but lymphopaenia and neutropenia were found in Boran cattle by [19] and [22]. Leukopenia is usually thought to be induced by trypanosomes [67], but here, leukocytosis was found even in susceptible ZFU. These variable features depend on the trypanosome strain [68], the breed and the individual and provide a reminder that infection characteristics are due to complex interactions between host cells and parasites.

Our study also strengthens the hypothesis of a link between the immune response and anaemia control proposed by [22]. Indeed, [22] also found that chimaeras with low PCV had low TWBC counts in comparison with NDA, and TWBC counts were independent from parasitaemia. Our data showed a significant positive correlation between PCV and TWBC, whereas TWBC values were not associated with parasitaemia control. Moreover, [22] suggested that differences in antibody titres between trypanotolerant and trypanosusceptible cattle may be a consequence and not a cause of differences in parasitaemia. Here, using ELISA detecting bovine IgG directed against total trypanosome antigens, it seemed that low parasitaemia resulted in low IgG titres directed against total antigens, which was the case for the two BOR and the ZFU with transient parasitaemia and which did not elicit an increase in PP (BOR5, BOR8 and ZFU4). However, before concluding on the absence of a role of antibodies in controlling parasitaemia, more specific studies on antibodies directed against specific parasite proteins would be needed.

Our study demonstrated the value of shorthorn taurine breeds, and especially Lagune, in relation to its strong adaptation to harsh environments, represented here by trypanosomes. Specific conservation plans need to be established for these breeds. We need now to determine if similar or different molecular mechanisms and genetic polymorphisms underlie trypanotolerance in shorthorn and longhorn taurines, which have different demographic histories [16]. Deciphering these molecular mechanisms using accurate immunological studies, and genome or transcriptome analyses, could improve knowledge on host-pathogen interactions and their evolution and is a prerequisite for developing new ways of controlling trypanosomes.

Supporting Information

S1 Fig. PCA and unsupervised hierarchical clustering results. A. PCA results. The individuals are plotted on the first two principal components according to their coordinates. Ellipses characterize the dispersion of each breed around its centre of gravity. The EUT, AFT and ZEB breeds are plotted in red, green and blue, respectively. The EUTxAFT, EUTxZEB and AFTxZEB admixed breeds previously sampled are shown in yellow and the newly sampled populations (BAOa, BORa, LAGa, NDAA and ZFUa) in black. B. Unsupervised hierarchical clustering results for the 545 individuals genotyped for 43,845 SNPs with an inferred number of clusters $k = 3$ obtained with Admixture 1.04. For each individual, the proportions of each cluster (y axis) which were interpreted as representative of EUT, AFT and ZEB ancestries are plotted in red, green and blue, respectively.

(PDF)

S1 Table. Results of the unsupervised hierarchical clustering. For each newly sampled breed and for its corresponding cattle breed that was previously genetically characterized [29], the average of cluster 1, 2 and 3 individual proportions, obtained with Admixture 1.04 ($k = 3$), are given and interpreted as representative of EUT, AFT and ZEB ancestries respectively.

(XLSX)

S2 Table. Raw phenotypic data. Breed; Ani = Animal; DPI = Day Post Infection; PCV = Packed Cell Volume; PA = Parasites in number of trypanosomes/ml; PA_count = Parasites in number of trypanosomes/microscopic observation; EUT = Percent assignment to cluster EUT with 54K SNP chip; AFT = Percent of assignment to cluster AFT with 54K SNP chip; ZEB = Percent of assignment to cluster ZEB with 54K SNP chip; TWBC = White cell rate (millions per ml); RBC = Red blood cell rate (billion per ml); Hb = Haemoglobin rate (g/dl); PP = Percentage of relative Positivity using indirect Elisa.

(XLSX)

S3 Table. Correlation between synthetic variables. Correlation values are indicated above the diagonal and *P*-values below the diagonal.

(XLSX)

Acknowledgments

The authors wish to thank breeders from Benin, Burkina Faso and Mali, and Dr Marcel Senou (University of Abomey-Calavi, Benin), Dr Faustin Fagbohoun (LABOVET, Benin) and the PAFILAV/Benin project for facilitating and allowing access to cattle, Dr Sylla, a veterinarian in Solenzo, for his help in selecting Fulani zebus, the National coordinator of PROGEBE Mali for N'Dama cattle from Mali. We also wish to thank Mathieu Gautier (CBGP, France) for providing scripts to perform genetic characterization, and Guy Noé and Marie-Noël Rossignol (Labogena, INRA, France) for providing support in genotyping. We thank Peter Biggins for having corrected the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: ST DB GKD LF IC. Performed the experiments: MP DB SS SB HS GKD. Analyzed the data: ST LF. Contributed reagents/materials/analysis tools: IC ST LF DB. Wrote the paper: ST DB LF GKD MP.

References

- Kristjansson PM, Swallow BM, Rowlands GJ, Kruska RL, de Leeuw PN (1999) Measuring the costs of African animal trypanosomosis, the potential benefits of control and returns to research. *Agric Syst* 59: 79–98.
- Swallow BM (2000) Impacts of Trypanosomiasis on African agriculture. Rome, Italy: FAO (Food and Agricultural Organization of the United Nations). 46 p.
- Shaw AP, Cecchi G, Wint GR, Mattioli RC, Robinson TP (2014) Mapping the economic benefits to live-stock keepers from intervening against bovine trypanosomosis in Eastern Africa. *Prev Vet Med* 113: 197–210. doi: [10.1016/j.prevetmed.2013.10.024](https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2013.10.024) PMID: [24275205](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24275205/)
- Uilenberg G (1998) A field guide for the diagnosis, treatment and prevention of African animal trypanosomosis. Rome: FAO.
- Hursey BS, Slingenbergh J (1995) The tsetse fly and its effects on agriculture in sub-saharan Africa. *World Animal Review* 84–85: 67–73.
- Mattioli RC, Feldmann U, Hendrickx G, Wint W, Jannin J, Slingenbergh J (2004) Tsetse and trypanosomiasis intervention policies supporting sustainable animal-agricultural development. *Journal of Food Agriculture & Environment* 2: 310–314.
- Geerts S, Holmes PH, Eisler MC, Diall O (2001) African bovine trypanosomiasis: the problem of drug resistance. *Trends Parasitol* 17: 25–28. PMID: [11137737](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11137737/)
- Solano P, Ravel S, de Meeus T (2010) How can tsetse population genetics contribute to African trypanosomiasis control? *Trends Parasitol*.
- Bouyer J, Bouyer F, Donadeu M, Rowan T, Napier G (2013) Community- and farmer-based management of animal African trypanosomosis in cattle. *Trends Parasitol* 29: 519–522. doi: [10.1016/j.pt.2013.08.003](https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.08.003) PMID: [24012356](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24012356/)
- Hanotte O, Dessie T, Kemp S (2010) Ecology. Time to tap Africa's livestock genomes. *Science* 328: 1640–1641. doi: [10.1126/science.1186254](https://doi.org/10.1126/science.1186254) PMID: [20576875](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20576875/)
- Hoare CA (1972) The trypanosomes of mammals. A zoological monograph; Publications BS, editor. Oxford.
- CIPEA (1979) Le bétail trypanotolérant d'Afrique occidentale et centrale. Addis Abeba, Ethiopie. 155 p.
- Pierre C (1906) L'élevage en Afrique occidentale française. Paris: Gouvernement général de l'Afrique occidentale française, Inspection de l'agriculture. 280 p.
- Chandler RL (1958) Studies on the tolerance of N'dama cattle to trypanosomiasis. *J Comp Pathol* 68: 253–260. PMID: [13525471](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13525471/)
- Murray M, Trail JC, Davis CE, Black SJ (1984) Genetic resistance to African Trypanosomiasis. *J Infect Dis* 149: 311–319. PMID: [6371153](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6371153/)
- Payne WJA, Hodges J (1997) Tropical cattle, origins, breeds and breeding policies. Oxford: Blackwell Science. 333 p.
- Chandler RL (1952) Comparative tolerance of West African N'dama cattle to trypanosomiasis. *Ann Trop Med Parasitol* 46: 127–134. PMID: [12986698](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12986698/)
- Roberts CJ, Gray AR (1973) Studies on trypanosome-resistant cattle. II. The effect of trypanosomiasis on N'dama, Muturu and Zebu cattle. *Trop Anim Health Prod* 5: 220–233. PMID: [4802602](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4802602/)
- Paling RW, Moloo SK, Scott JR, McOdimba FA, Logan-Henfrey LL, Murray M et al. (1991) Susceptibility of N'Dama and Boran cattle to tsetse-transmitted primary and challenge infections with a homologous serodeme of *Trypanosoma congolense*. *Parasite Immunol* 13: 413–425. PMID: [1923566](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1923566/)
- Paling RW, Moloo SK, Scott JR, Gettinby G, McOdimba FA, Murray M (1991) Susceptibility of N'Dama and Boran cattle to sequential challenges with tsetse-transmitted clones of *Trypanosoma congolense*. *Parasite Immunol* 13: 427–445. PMID: [1923567](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1923567/)
- Nijman IJ, Otsen M, Verkaar EL, de Ruijter C, Hanekamp E, Ochieng JW et al. (2003) Hybridization of banteng (*Bos javanicus*) and zebu (*Bos indicus*) revealed by mitochondrial DNA, satellite DNA, AFLP and microsatellites. *Heredity* 90: 10–16. PMID: [12522420](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12522420/)
- Naessens J, Leak SG, Kennedy DJ, Kemp SJ, Teale AJ (2003) Responses of bovine chimaeras combining trypanosomosis resistant and susceptible genotypes to experimental infection with *Trypanosoma congolense*. *Vet Parasitol* 111: 125–142. PMID: [12531289](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12531289/)
- Van der Waaij EH, Hanotte O, Van Arendonk JAM, Kemp SJ, Kennedy D, Gibson JP et al. (2003) Population parameters for traits defining trypanotolerance in a F2 cross of N'Dama and Boran cattle. *Livest Sci* 84: 219–230.
- Aboagye Gs, Tawah CL, Rege E (1994) Shorthorn cattle of West and Central Africa. III. Physical, adaptive and special genetic characteristics. *World Animal Review* 78: 22–32.

25. Roelants GE, Tamboura I, Sidiki DB, Bassinga A, Pinder M (1983) Trypanotolerance. an individual not a breed character. *Acta Trop* 40: 99–104. PMID: [6136179](#)
26. Pinder M, Bauer J, Fumoux F, Roelants GE (1987) *Trypanosoma congolense*: lack of correlation between the resistance of cattle subjected to experimental cyclic infection or to field challenge. *Exp Parasitol* 64: 410–417. PMID: [3678447](#)
27. Authie E, Pobel T (1990) Serum haemolytic complement activity and C3 levels in bovine trypanosomiasis under natural conditions of challenge—early indications of individual susceptibility to disease. *Vet Parasitol* 35: 43–59. PMID: [2343531](#)
28. Doko A, Verhulst A, Pandey VS, Van der Stuyt P (1997) Artificially induced *Trypanosoma brucei brucei* infection in Lagune and Borgou cattle in Benin. *Vet Parasitol* 69: 151–157. PMID: [9187040](#)
29. Gautier M, Flori L, Riebler A, Jaffrezic F, Laloe D, Gut I et al. (2009) A whole genome Bayesian scan for adaptive genetic divergence in West African cattle. *BMC Genomics* 10: 550. doi: [10.1186/1471-2164-10-550](#) PMID: [19930592](#)
30. Flori L, Thevenon S, Dayo GK, Senou M, Sylla S, Berthier D et al. (2014) Adaptive admixture in the West African bovine hybrid zone: insight from the Borgou population. *Mol Ecol* 23: 3241–3257. doi: [10.1111/mec.12816](#) PMID: [24888437](#)
31. Mattioli RC, Faye JA, Buscher P (1999) Susceptibility of N'Dama cattle to experimental challenge and cross-species superchallenges with bloodstream forms of *Trypanosoma congolense* and *T. vivax*. *Vet Parasitol* 86: 83–94. PMID: [10496692](#)
32. Dayo GK, Bengaly Z, Messad S, Bucheton B, Sidibe I, Cene B et al. (2010) Prevalence and incidence of bovine trypanosomiasis in an agro-pastoral area of southwestern Burkina Faso. *Res Vet Sci* 88: 470–477. doi: [10.1016/j.rvsc.2009.10.010](#) PMID: [20044115](#)
33. Murray M, Murray PK, McIntyre WIM (1977) An improved parasitological technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 71: 325–326. PMID: [563634](#)
34. Desquesnes M, Bengaly Z, Millogo L, Meme Y, Sakande H (2001) The analysis of the cross-reactions occurring in antibody-ELISA for the detection of trypanosomes can improve identification of the parasite species involved. *Ann Trop Med Parasitol* 95: 141–155. PMID: [11299121](#)
35. Hijmans RJ, Guarino L, Cruz M, Rojas E (2001) Computer tools for spatial analysis of plant genetic resources data: 1. Diva-gis. *Plant Genetic Resources Newsletter* 127: 15–19.
36. Busby JR (1991) Bioclim—a bioclimate analysis and prediction system. In: Margulier CR, Austin MP, editors. *Nature Conservation: Cost Effective Biological Surveys and Data Analysis*. CSIRO, Australia. pp. 64–68.
37. OCDE (2009) *West African studies: Regional Atlas on West Africa*. Paris: OCDE. 284 p.
38. Courtin F, Sidibe I, Rouamba J, Jamonneau V, Gouro A, Solano P et al. (2009) Impacts des évolutions démographiques et climatiques sur la répartition spatiale des hommes, des tsé-tsé et des trypanosomoses en Afrique de l'Ouest. *Parasite* 16: 3–10. PMID: [19353946](#)
39. Matukumalli LK, Lawley CT, Schnabel RD, Taylor JF, Allan MF, Heaton MP et al. (2009) Development and characterization of a high density SNP genotyping assay for cattle. *PLoS One* 4: e5350. doi: [10.1371/journal.pone.0005350](#) PMID: [19390634](#)
40. Gautier M, Laloe D, Moazami-Goudarzi K (2010) Insights into the genetic history of French cattle from dense SNP data on 47 worldwide breeds. *PLoS One* 5.
41. Patterson N, Price AL, Reich D (2006) Population structure and eigenanalysis. *PLoS Genet* 2: e190. PMID: [17194218](#)
42. Chessel D (2004) The ade4 package. I. One-table methods. *R News* 4: 5–10.
43. Alexander DH, Novembre J, Lange K (2009) Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. *Genome Res* 19: 1655–1664. doi: [10.1101/gr.094052.109](#) PMID: [19648217](#)
44. Geigy R, Kauffmann M (1973) Sleeping sickness survey in the Serengeti area (Tanzania) 1971. I. Examination of large mammals for trypanosomes. *Acta Trop* 30: 12–23. PMID: [4144952](#)
45. Nantulya VM, Musoke AJ, Rurangirwa FR, Moloo SK (1984) Resistance of cattle to tsetse-transmitted challenge with *Trypanosoma brucei* or *Trypanosoma congolense* after spontaneous recovery from syringe-passaged infections. *Infect Immun* 43: 735–738. PMID: [6693173](#)
46. Holzmüller P, Biron DG, Courtois P, Koffi M, Bras-Goncalves R, Daulouede S et al. (2008) Virulence and pathogenicity patterns of *Trypanosoma brucei gambiense* field isolates in experimentally infected mouse: differences in host immune response modulation by secretome and proteomics. *Microbes Infect* 10: 79–86. PMID: [18068387](#)
47. Berthier D, Chantal I, Thevenon S, Marti J, Piquemal D, Maillard JC (2006) Bovine transcriptome analysis by SAGE technology during an experimental *Trypanosoma congolense* infection. *Ann N Y Acad Sci* 1081: 286–299. PMID: [17135528](#)

48. Berthier D, Chantal I, Thevenon S, Sakande H, Maillard JC, Bengaly Z et al. (2008) Study of bovine trypanotolerance by whole transcriptome analysis. *Ann N Y Acad Sci* 1149: 71–76. doi: [10.1196/annals.1428.062](https://doi.org/10.1196/annals.1428.062) PMID: [19120177](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19120177/)
49. Paris J, Murray M, McOdimba F (1982) A comparative evaluation of the parasitological techniques currently available for the diagnosis of African trypanosomiasis in cattle. *Acta Trop* 39: 307–316. PMID: [6131590](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6131590/)
50. Desquesnes M (1997) [International and regional standardization of immunoenzyme tests: methods, concerns and limitations]. *Rev Sci Tech* 16: 809–823. PMID: [9567307](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9567307/)
51. Pinheiro JC, Bates DM, DebRoy S, Sarkar D, Team RC (2014) nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1–117 ed.
52. Pinheiro JC, Bates DM (2000) Mixed-effects models in S and S-PLUS; Chambers J, Eddy W, Härdle W, Sheather S, Tierney L, editors. New-York: Springer-Verlag. 528 p.
53. Fournier DA, Skaug HJ, Ancheta J, Ianelli J, Magnusson A, Maunder MN et al. (2012) AD Model Builder: using automatic differentiation for statistical inference of highly parameterized complex nonlinear models. *Optimization Methods & Software* 27: 233–249.
54. Dayo GK, Gautier M, Berthier D, Poivey JP, Sidibe I, Cuny G et al. (2012) Association studies in QTL regions linked to bovine trypanotolerance in a West African crossbred population. *Anim Genet* 43: 123–132. doi: [10.1111/j.1365-2052.2011.02227.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2011.02227.x) PMID: [22404348](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22404348/)
55. Rowlands GJ, Mulatu W, Nagda SM, d'Ieteren GD (1995) Variations in packed red cell volume and trypanosome prevalence and relationships with reproductive traits in east African Zebu cows exposed to drug-resistant trypanosomes. *Acta Trop* 59: 105–116. PMID: [7676902](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7676902/)
56. Trail JC, d'Ieteren GD, Feron A, Kakiese O, Mulungu M, Pelo M (1991) Effect of trypanosome infection, control of parasitaemia and control of anaemia development on productivity of N'Dama cattle. *Acta Trop* 48: 37–45.
57. Trail JC, d'Ieteren GD, Maille JC, Yangari G (1991) Genetic aspects of control of anaemia development in trypanotolerant N'Dama cattle. *Acta Trop* 48: 285–291. PMID: [1674402](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1674402/)
58. Trail JC, d'Ieteren GD, Murray M, Ordner G, Yangari G, Collardelle C et al. (1993) Measurement of trypanotolerance criteria and their effect on reproductive performance of N'Dama cattle. *Vet Parasitol* 45: 241–255. PMID: [8447067](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8447067/)
59. Codjia V (1981) Trypanotolérance et immunité, recherches sur les taurins de la République populaire du Bénin. Dakar: Université de médecine et de pharmacie de Dakar. 96 p.
60. Wint W, Rogers D (2000) Predicted distributions of tsetse in Africa. Rome, FAO. 60 p.
61. Williams DJ, Naessens J, Scott JR, McOdimba FA (1991) Analysis of peripheral leucocyte populations in N'Dama and Boran cattle following a rechallenge infection with *Trypanosoma congolense*. *Parasite Immunol* 13: 171–185. PMID: [1711196](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1711196/)
62. Bellier S, Cordonnier N (2010) Les valeurs usuelles en hématologie vétérinaire. *Revue francophone des laboratoires* 420: 27–42.
63. Trail JC, Wissocq N, d'Ieteren GD, Kakiese O, Murray M (1994) Quantitative phenotyping of N'Dama cattle for aspects of trypanotolerance under field tsetse challenge. *Vet Parasitol* 55: 185–195. PMID: [7879377](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7879377/)
64. Stijlemans B, Guillems M, Raes G, Beschin A, Magez S, De Baetselier P (2007) African trypanosomiasis: from immune escape and immunopathology to immune intervention. *Vet Parasitol* 148: 3–13. PMID: [17560035](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17560035/)
65. Naessens J (2006) Bovine trypanotolerance: A natural ability to prevent severe anaemia and haemophagocytic syndrome? *Int J Parasitol* 36: 521–528. PMID: [16678182](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16678182/)
66. Esievo KAN, Saror DI, Kolo MN, Eduvie LO (1986) Erythrocyte Surface Sialic-Acid in N'dama and Zebu Cattle. *J Comp Pathol* 96: 95–99. PMID: [3944290](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3944290/)
67. Authie E (1993) Contribution à l'étude des mécanismes immunologiques impliqués dans la trypanotolérance des taurins d'Afrique [Thèse d'université]. Bordeaux: Université de Bordeaux II. 157 p.
68. Desquesnes M, Bengaly Z, Dia ML (2003) Evaluation de la persistance des anticorps détectés par Elisa-indirect *Trypanosoma vivax* après traitement trypanocide chez des bovins naturellement infectés. *Rev Elev Med Vet Pays Trop* 56: 141–144.

Annexe 3

Courtin, F., M. Camara, J.-B. Rayaisse, M. Kagbadouno, E. Dama, O. Camara, I. S. Traoré, J. Rouamba, M. Peylhard, M. B. Somda, M. Leno, M. J. Lehane, S. J. Torr, P. Solano, V. Jamonneau and B. Bucheton (2015). "Reducing Human-Tsetse Contact Significantly Enhances the Efficacy of Sleeping Sickness Active Screening Campaigns: A Promising Result in the Context of Elimination." *PLOS Neglected Tropical Diseases* 9(8): e0003727.

RESEARCH ARTICLE

Reducing Human-Tsetse Contact Significantly Enhances the Efficacy of Sleeping Sickness Active Screening Campaigns: A Promising Result in the Context of Elimination

Fabrice Courtin¹, Mamadou Camara², Jean-Baptiste Rayaisse³, Moise Kagbadouno², Emilie Dama³, Oumou Camara², Ibrahima S. Traoré², Jérémie Rouamba⁴, Moana Peylhard¹, Martin B. Somda³, Mamadou Leno², Mike J. Lehane^{5*}, Steve J. Torr⁵, Philippe Solano¹, Vincent Jamonneau¹, Bruno Bucheton⁶

1 IRD, UMR 177 IRD-CIRAD INTERTRYP, CIRDES 01 BP 454, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso, **2** PNLTHA, Ministère de la Santé, Conakry, République de Guinée, **3** CIRDES URBO, 01 BP 454, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso, **4** Centre MURAZ, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso, **5** Liverpool School of Tropical Medicine, Liverpool, United Kingdom, **6** IRD, UMR 177 IRD-CIRAD INTERTRYP, PNLTHA-Ministère de la Santé, Conakry, République de Guinée

* Mike.Lehane@lstm.ac.uk



OPEN ACCESS

Citation: Courtin F, Camara M, Rayaisse J-B, Kagbadouno M, Dama E, Camara O, et al. (2015) Reducing Human-Tsetse Contact Significantly Enhances the Efficacy of Sleeping Sickness Active Screening Campaigns: A Promising Result in the Context of Elimination. *PLoS Negl Trop Dis* 9(8): e0003727. doi:10.1371/journal.pntd.0003727

Editor: Serap Aksoy, Yale School of Public Health, UNITED STATES

Received: December 15, 2014

Accepted: March 30, 2015

Published: August 12, 2015

Copyright: © 2015 Courtin et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: The work was supported by the Bill and Melinda Gates Foundation (grant number 1017770) and by the World Health Organisation. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Background

Control of gambiense sleeping sickness, a neglected tropical disease targeted for elimination by 2020, relies mainly on mass screening of populations at risk and treatment of cases. This strategy is however challenged by the existence of undetected reservoirs of parasites that contribute to the maintenance of transmission. In this study, performed in the Boffa disease focus of Guinea, we evaluated the value of adding vector control to medical surveys and measured its impact on disease burden.

Methods

The focus was divided into two parts (screen and treat in the western part; screen and treat plus vector control in the eastern part) separated by the Rio Pongo river. Population census and baseline entomological data were collected from the entire focus at the beginning of the study and insecticide impregnated targets were deployed on the eastern bank only. Medical surveys were performed in both areas in 2012 and 2013.

Findings

In the vector control area, there was an 80% decrease in tsetse density, resulting in a significant decrease of human tsetse contacts, and a decrease of disease prevalence (from 0.3% to 0.1%; $p=0.01$), and an almost nil incidence of new infections ($<0.1\%$). In contrast,

incidence was 10 times higher in the area without vector control ($>1\%$, $p<0.0001$) with a disease prevalence increasing slightly (from 0.5 to 0.7%, $p=0.34$).

Interpretation

Combining medical and vector control was decisive in reducing *T. b. gambiense* transmission and in speeding up progress towards elimination. Similar strategies could be applied in other foci.

Author Summary

Sleeping sickness is a serious neglected tropical disease which has been targeted for elimination by 2020. Currently, control relies on mass screening populations at risk and treatment of cases. This strategy is compromised because it is often impossible to reach more than 75% of the population. An alternate method is to kill the tsetse fly which transmits the parasite causing the disease. To determine the value of adding vector control to medical interventions we undertook a vector control programme alongside a screen and treat programme in the Boffa disease focus of Guinea. We divided the focus into two parts (screen and treat in the western part; screen and treat plus vector control in the eastern part). In the vector control area, there was an 80% decrease in tsetse density and a decrease of disease prevalence from three cases per thousand to one case per thousand with almost no new cases being contracted during the control period. In contrast, incidence was 10 times higher in the area without vector control. Combining medical and vector control was decisive in reducing sleeping sickness transmission and could speed up the elimination process. Similar strategies could be applied in other foci.

Introduction

Human African Trypanosomiasis (HAT), also known as sleeping sickness, is a lethal parasitic disease that afflicts poor rural communities in remote parts of Africa and is included in the list of neglected tropical disease of the London declaration that are foreseen for elimination as public health problems by 2020 [1]. The disease is caused by trypanosomes transmitted by an insect vector, the tsetse fly. There are two forms of HAT: one, known as gambiense HAT, is endemic in West and Central Africa and causes over 95% of current cases; the other, known as rhodesiense HAT, is endemic in East and southern Africa [2]. The presence of parasites in the brain is associated with a disturbance of the sleep-wake cycle and the progressive appearance of neurological disorders. Eventually, patients fall into a coma and die if not treated. There is no vaccine, and available drugs are toxic and require several days of complete hospitalization despite recent improvements [3].

Active case detection by mass screening of the population and treatment has proven effective in lowering HAT prevalence [2]. However, there are a number of foci where the screen and treat strategy, despite saving many lives and preventing large outbreaks from occurring, has failed to bring HAT under effective control. Low attendance of the population at medical surveys, combined with the existence of human and/or animal carriers with cryptic infections escaping the screen and treat strategy, are important factors impairing the efficacy of control measures targeting confirmed HAT patients only [4]. Whereas vector control is an important arm in the control of animal trypanosomiasis and rhodesiense HAT [5], it has been scarcely

used in gambiense HAT in part because vector control was considered too costly and too difficult to deliver in resource poor settings [6]. Recently, a new cost effective and environment friendly technology, based on the deployment of small insecticide-impregnated targets has been developed [7,8] and was for the first time implemented here in an active gambiense HAT focus. Our goals were to evaluate its efficiency (i) in lowering tsetse densities and human tsetse contact and (ii) in reducing the burden of HAT.

The study was performed in the mangrove area of Boffa, one of the most active foci in West Africa. Mangroves display a favorable biotope for *Glossina* (*G.*) *palpalis* (*p.*) *gambiensis* leading to a high exposure of the population to tsetse bites. The population living in mangrove areas is often difficult to access and characterized by an important daily and seasonal mobility. Both are major factors impairing the efficacy of medical surveys and this is in part responsible for the persistence of HAT in such foci. As part of a strong resolve by the government of Guinea to tackle HAT in the coastal part of the country, a vector control intervention was combined with the classical medical one, in order to improve HAT control and to accurately measure the added value of integrating vector interventions in the country's control strategy. The focus was divided into two areas separated by the Rio Pongo River. Medical surveys covering the entire population were performed in 2012 and 2013 but insecticide impregnated targets were only deployed on the eastern bank. We demonstrate a remarkable decrease of *T. b. gambiense* transmission in the area where the two strategies were combined.

Methods

Ethical statement

This study is part of a HAT elimination programmer in coastal Guinea (ElimTrypGui) that was approved by the Guinean Minister of Health (234/MSHP/CAB/2013). The Ministry of Health of the Republic of Guinea has approved the study protocols and given the administrative authorizations for the activities performed within this study by the National Control Programme. Mass screening and treatment of HAT patients were performed according to the national Guinean HAT procedures as recommended by the World Health Organization. Information on HAT and the study objectives was provided to the population both (i) on a household basis during the census of the population and distribution of invitations to participate in medical surveys and (ii) through discussion groups organized with the Boffa district health authorities and village administrative and religious authorities. Consent to participate was oral and reflected by the participation or not in the medical surveys. No human biological samples other than those required for HAT diagnosis were taken from participants in the frame of this study.

Study area and control strategies

The study was carried out in the Boffa HAT focus located in a mangrove area of coastal Guinea. Most of the population is from the Soussou ethnic group and lives in small villages scattered along mangrove channels. The main occupations are rice cultivation, fishing, wood cutting and salt extracting, all activities that bring the population into close contact with *G. p. gambiensis* the only vector of *T. b. gambiense* in these areas. Population characteristics, human settlements and density and geographic distribution of tsetse flies in this focus have already been described in detail [9]. The focus was divided into two parts separated by the Rio Pongo River. In "Boffa West" (western bank, 320 km²) only the medical activities ("screen and treat") were performed. In "Boffa East" (320 km²) insecticide-impregnated targets were deployed to reduce tsetse densities in addition to medical surveys. A detailed flow chart of activities is given in Fig 1.

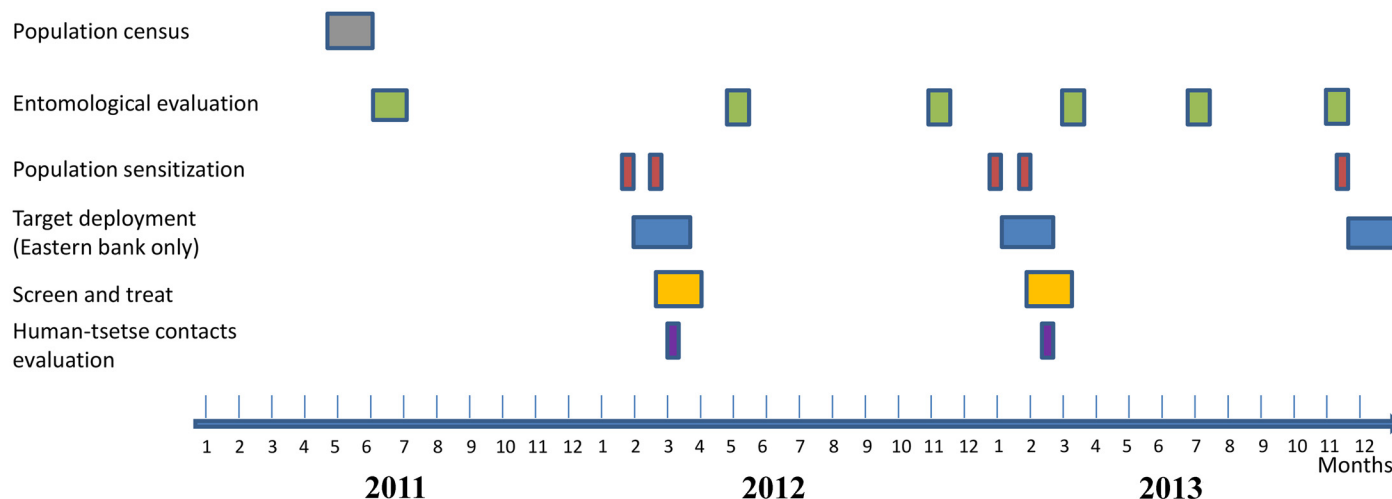


Fig 1. Flow chart showing the different activities implemented in the sleeping sickness focus of Boffa.

doi:10.1371/journal.pntd.0003727.g001

HAT has been known to occur in Boffa since colonial times. Prior to this study, efforts to control the disease in this focus has been through passive detection of HAT patients at the Dubreka treatment center (located 150 km away) and targeted screening of villages reporting cases by mobile teams. A total of 229 patients from the Boffa focus were diagnosed and treated by the NCP between 2002 and 2009.

Population census and medical surveys

An exhaustive census of the population was performed in May 2011 during which each household was geo-referenced. For each inhabitant, first name, second name, sex and age were recorded. Each household family was given a unique code, to which a number was added for each family member thus giving a unique individual identifier. The 74 human settlements (villages, hamlets, encampments) that were mapped in the study area are shown in Fig 2. They comprised a population of 20,496 inhabitants: 29 settlements and 4,474 inhabitants in Boffa West, and 45 settlements and 16,022 inhabitants in Boffa East, respectively. Newly settled families and seasonal workers presenting to the medical surveys in 2012 ($n = 4,094$) and 2013 ($n = 3,189$) were also added to the census database which finally included 27,779 individuals in 2013.

Two medical surveys, in which all villages from the entire study area were visited by a mobile medical team, were organized in 2012 just after target deployment. This was repeated in 2013. Prior to each survey, population sensitization was undertaken to inform village authorities of the passage of the medical team and to distribute household census printed sheets that were used during surveys to record attendance and results of diagnostic tests. During surveys, all participating inhabitants were tested with the Card Agglutination Test for Trypanosomiasis (CATT) [10]. Two-fold plasma dilutions were tested for each positive individual and parasitological tests (direct microscopic examination of lymph node aspirate and/or mini-anion exchange centrifugation test on buffy-coat [11]) were performed for all individuals with CATT end titer $> 1/4$. Since the CATT is known to be prone to unspecific agglutinations, one ml of left over plasma was sampled from every CATT positive subjects and was frozen until use. These samples were used to perform the highly specific immune trypanolysis test (TL) using cloned populations of *T. b. gambiense* variable antigen type (VAT) LiTat 1.3 [12,13]. Only individuals that tested positive to the CATT and to TL were considered to harbor *T. b.*



Fig 2. Map of the study area indicating the location of settlements.

doi:10.1371/journal.pntd.0003727.g002

gambiense specific antibodies. At the end of each medical survey, all parasitological positive subjects were treated according to the national treatment procedure, which is pentamidine for 1st stage infections, and the Nifurtimox-Eflornithine combination therapy for 2nd stage infections, as recently recommended [3].

Vector control and monitoring

Entomological monitoring. Baseline entomological data (the reference data-sampling round 0) were collected from the study area prior to the intervention in May 2011 [9] and were used to direct target deployment in the vector control area. Throughout the entire programme five monitoring surveys (rounds 1 to 5) were implemented to assess changes in the tsetse density in the study area. For this, 58 geo-referenced sentinel traps were positioned for 48 hours at fixed sites to allow comparison between surveys: 47 were located in Boffa East (vector control) and 11 in Boffa West (no vector control).

Target deployment. The aim of target deployment was not to eliminate tsetse flies but rather to reduce human-tsetse contact in order to protect people from infective tsetse bites. Targets were thus deployed in places where people live and work (favorable vegetation around villages, pirogue jetties, watering points, agricultural sites, main foot paths and mangrove channels). The targets have a central panel (0.5 x 0.5 m) of blue polyester impregnated each with deltamethrin (300 mg/m²) flanked by two panels of black polyethylene netting (0.5 m high x 0.25 m wide each) also insecticide impregnated. Each target also included a bag containing 2 ml of octenol and para-cresol (1:2) as olfactory attractant for tsetse. Targets were bought from a commercial company every year, and were erected using locally cut wooden sticks or

were hung from the branches of trees (see [S1 Text](#) for more details). In February 2012, a total of 3,926 insecticide-treated targets were deployed in Boffa East. Targets were replaced by new ones each year at the end of the rainy season in december 2012 and december 2013.

Additional targets were deployed at new sites to improve spatial coverage, giving a total of 4,673 geo-referenced sites used for targets deployment and a mean number of 15 targets/km² ([S1 Fig](#)).

Evaluation of human exposure to tsetse flies. In order to measure the level of human exposure to tsetse bites, the IgGs responses directed against the Tsgf1₁₈₋₄₃ synthetic peptide shown to be specific to tsetse saliva [[14–16](#)] were quantified. Ten sentinel villages were selected for this purpose (four in Boffa West and six in Boffa East, [Fig 2](#)). In these villages plasma samples were collected from heparinised capillary tubes taken from all inhabitants older than five years old who participated in medical surveys. In 2012, 252 and 652 samples were obtained from Boffa West and Boffa East, respectively. In 2013, 395 and 539 were obtained from Boffa West and Boffa East, respectively. The quantification of anti-Tsgf1₁₈₋₄₃ IgGs was performed by an indirect-ELISA assay as described previously [[16](#)].

Statistical analyses

The tsetse densities obtained at every monitoring period in both the vector control area and the non-vector control area were compared using the Wilcoxon matched-pairs signed-rank test using T0 data as the reference. The impact of the vector control intervention on the evolution of tsetse densities was evaluated by constructing a mixed linear regression model of the mean number of catches/day/trap including the trapping site as a random effect and the period of sampling and deployment of impregnated targets as fixed effects. The Wilcoxon matched-pairs signed-rank test was used to compare the evolution of Tsgf1₁₈₋₄₃ IgG responses (2012–2013) in sentinel villages from Boffa West and Boffa East. The chi square test was used to assess prevalence differences of specific serology and HAT between years or study areas. The Fisher exact test was used to compare incidences of specific sero-conversion events and of confirmed HAT cases.

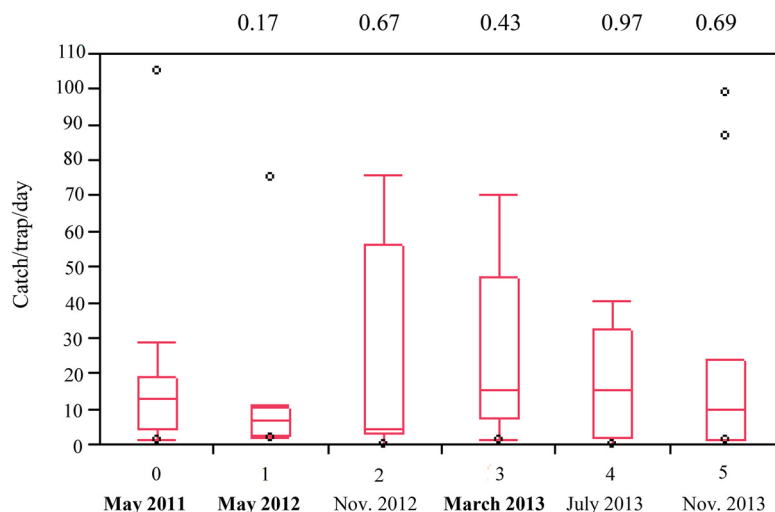
Results

Vector control

Impact on tsetse densities. The evolution of tsetse densities in the study area, as measured by sentinel traps, is shown in [Fig 3](#). In the area where insecticide-impregnated targets were deployed, the number of tsetse caught was found to be significantly reduced at all-time points as compared to the pre-treatment evaluation. Starting from a median of 3 flies/trap/day in the pre-intervention monitoring round, tsetse densities decreased to 0.5 one year and half later (round 5), corresponding to an overall 80% decrease. In contrast, no significant differences were observed at any of the monitoring rounds, in the area where no vector control was initiated (Boffa West). This study was not designed to demonstrate seasonal effects, as most monitoring rounds were performed during the dry season (except the one in July 2013). In mangroves, environmental conditions are favorable to tsetse flies all year long, it is nevertheless known that the efficacy of tsetse catches are affected by factors such as wind, rain or tide coefficients. To take this into account, we used a mixed linear model including the tsetse traps as a random effect and the date of sampling and deployment of targets as fixed effects ([Table 1](#)). We indeed detected a significant effect of the date of sampling ($p = 0.0027$) and a highly significant effect of target deployment ($p < 0.0001$) on tsetse densities.

Evolution of human exposure to tsetse flies. In agreement with the entomological data, a highly significant decrease of Tsgf1₁₈₋₄₃ ELISA titres was observed in sentinel villages from the

a. Boffa West



b. Boffa East

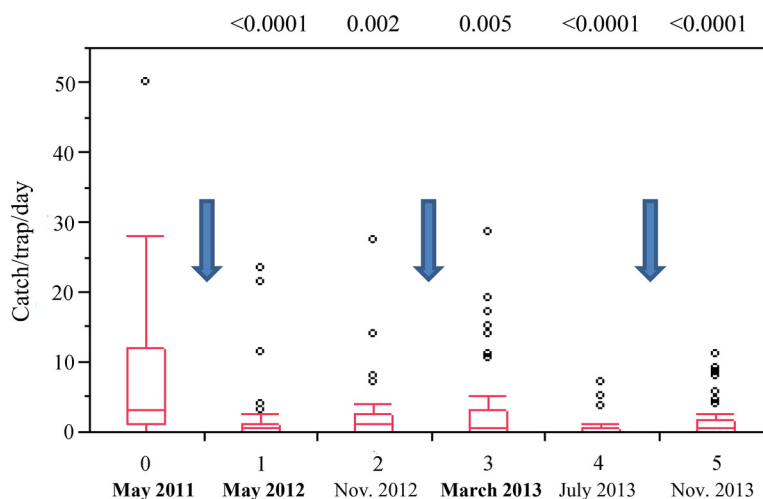


Fig 3. Evolution of tsetse densities during the study period in the Boffa focus. Box plots showing the median and 10th, 25th, 75th and 90th centiles of catches of tsetse from six sampling rounds (May 2011—November 2013) in Boffa West (a.) where no tsetse control intervention was initiated and Boffa East (b.) where insecticide-impregnated targets were deployed. Blue arrows indicate insecticide-impregnated target deployment/replacement. P-values of the difference between each monitoring round and pre-treatment data in May 2011 are indicated (Wilcoxon matched-pairs signed-rank test).

doi:10.1371/journal.pntd.0003727.g003

vector control area ($p < 0.0001$) in 2013. In contrast those from the area without vector control displayed a modest increase ($p = 0.03$). Analysis of the distribution of anti-Tsgf1₁₈₋₄₃ IgG levels in the vector control area in 2012 and 2013 suggest that a major impact of target deployment was to reduce the number of high responders that are likely to be the most exposed to tsetse bites. Whereas individuals with high Tsgf1₁₈₋₄₃ ELISA titres (optical density > 1.42) represented 25% of the total population in 2012, this proportion fell to less than 4% in 2013 (Fig 4).

Table 1. Mixed linear regression model of the impact of target deployment on tsetse catches in the Boffa focus.

Fixed effects	Nb of coefficient		Means of catches/day Least squares (\pm standard error)	F ratio	Prob. >F
Sampling round	5		-	3.7459	0.0027
Target deployment	1	yes	2.99 (\pm 1.29)	26.7620	< 0.0001
		no	18.17 (\pm 2.63)		

Mixed linear regression was used to model the response variable that was the mean number of catches/day/trap. The trapping site was included as a random effect and the period of sampling and deployment of impregnated targets as fixed effects.

doi:10.1371/journal.pntd.0003727.t001

Disease prevalence and incidence

Out of the 27,779 individuals registered in the census database in 2013, 17,203 participated in at least one of the two surveys performed in 2012 and 2013 (61.9%) and 10,576 participated in neither (38.1%). Population coverage over the two surveys was higher in Boffa West (73%) than in Boffa East (58.4%).

During the 2012 survey, *T. b. gambiense* specific antibodies were detected in 0.93 and 0.43% of the population in Boffa West and Boffa East, respectively, whereas the presence of

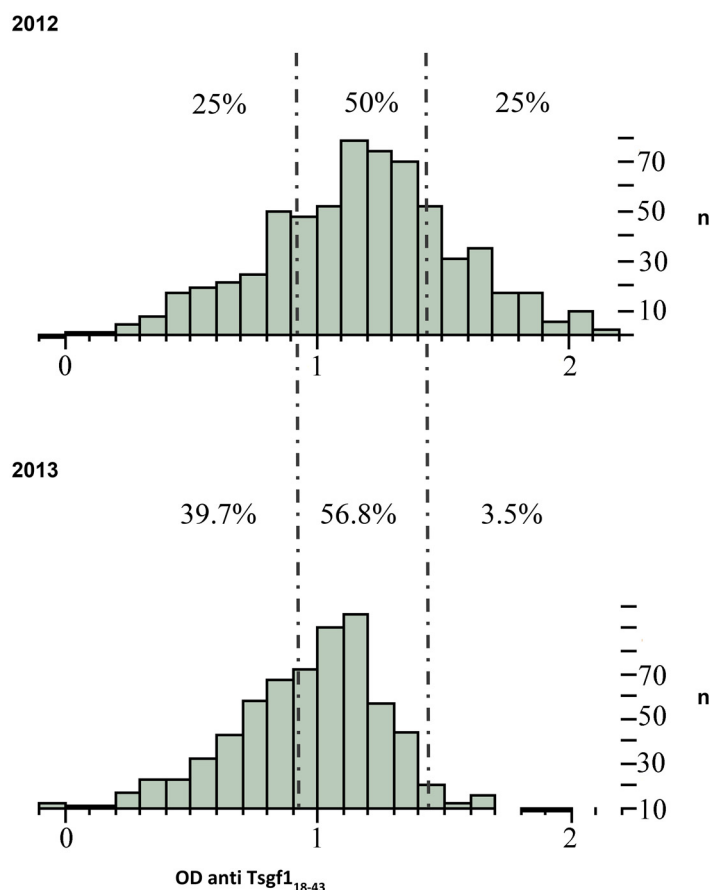


Fig 4. Histogram showing the changes of anti Tsgf18-43 IgGs responses in 2012 and 2013 in the vector control area (Boffa East). Distributions of anti Tsgf18-43 Elisa optical densities obtained from 652 individuals in 2012 and 539 individuals in 2013 sampled in sentinel villages of the vector control area (Boffa East). Dashed lines represent the quartiles of the IgG response calculated in 2012.

doi:10.1371/journal.pntd.0003727.g004

Table 2. Evolution of seroprevalence and disease prevalence in the Boffa HAT focus.

	Boffa West (no vector control)			Boffa East (vector control)		
	2012	2013	P ⁴	2012	2013	P ⁴
Number tested	3344	2885		7927	6564	
CATT ¹ positive	103 (3.08%)	68 (2.36%)	0.08	134 (1.69%)	87 (1.32%)	0.07
Specific serology (CATT+/TL+) ²	31 (0.93%)	26 (0.9%)	0.92	34 (0.43%)	13 (0.2%)	0.01
Confirmed HAT ³	18 (0.54%)	21 (0.73%)	0.34	24 (0.30%)	7 (0.11%)	0.01
Unconfirmed with specific serology	13 (0.39%)	5 (0.17%)	0.11	10 (0.13%)	6 (0.09%)	0.53

Prevalence data (in brackets) were calculated according to the total population tested in each of the two areas in 2012 and 2013. Former HAT patients who were diagnosed and treated prior to the 2012 survey (14 and 11 in Boffa West and Boffa East respectively) and to the 2013 survey (26 and 28 in Boffa West and Boffa East respectively) were removed from this analysis.

¹ Card Agglutination Test for Trypanosomiasis

² Individuals that were both positive to the CATT and the *T. b. gambiense* immune trypanolysis test were considered to harbour a specific serology to *T. b. gambiense*.

³ Trypanosomes were detected by direct microscopic examination of lymph node aspirates or by the mini-anion exchange centrifugation test performed on buffy coat.

⁴ Pearson's Chi-squared test P-value (2012–2013 comparison).

doi:10.1371/journal.pntd.0003727.t002

trypanosomes was confirmed by microscopy in 0.54 and 0.30%. In contrast to the situation in Boffa West where the prevalence of specific serology and HAT remained stable between 2012 and 2013, a significant decrease of both specific serology (0.2% in 2013; $p = 0.01$) and HAT prevalence (0.11% in 2013; $p = 0.01$) was observed in Boffa East where impregnated targets were deployed (Table 2).

Similar observations were made on the population of new comers (not present during the population census in 2011 but who participated in medical surveys in 2012 and 2013). In 2012, prevalence of HAT in this population was 0.2% (7/2806) and 0.3% (4/1288) on the Eastern and Western Bank, respectively. In contrast no HAT cases were detected in 2094 newly settled inhabitants in Boffa East in 2013 whereas HAT prevalence remained at 0.3% (3/1095) in Boffa West. In order to accurately assess the impact of HAT control on *T. b. gambiense* transmission we then calculated the number of specific seroconversion events amongst individuals who tested negative to the CATT in 2012 and who were seen again in 2013 (1,279 in Boffa West and 2,277 in Boffa East). In Boffa West, 16 specific sero-conversion events were detected and 14 were confirmed parasitologically (incidence of 1.09%). The incidence of new seroconversion events was significantly lower in Boffa East (incidence = 0.07%; $p < 0.0001$) where only two new HAT cases were diagnosed (Table 3).

Discussion

Our results show that the deployment of targets in the eastern part of the Boffa focus had a very significant impact on HAT prevalence and incidence. Although the decrease in tsetse density was not greater than 80%, this was enough to significantly reduce *T. b. gambiense* transmission within a few months, whereas in the “no vector control” area, the number of HAT cases remained stable. The need to add vector control activities to medical activities for gambiense HAT has already been pointed out [6,17,18], but the present study is the first one to accurately measure what it brings in terms of reduction of HAT transmission.

Table 3. Incidence of new infection events.

	Boffa West no vector control		Boffa East with impregnated targets		P ³
	n	Incidence (%)	n	Incidence (%)	
CATT negative in 2012	1279		2777		
CATT+ TL+ in 2013 ¹	16	1.25	2	0.07	<0.0001
Confirmed HAT in 2013 ²	14	1.09	2	0.07	<0.0001

The incidence of new specific sero-conversion events and of confirmed HAT cases was calculated in Boffa West and Boffa East based on individuals that tested negative to the CATT in 2012 and who were seen again during the 2013 medical survey.

¹ Positive to the CATT test and positive to the *T. b. gambiense* immune trypanolysis test

² Trypanosomes were detected by direct microscopic examination of lymph node aspirates or by the mini-anion exchange centrifugation test performed on buffy coat.

³ P-value (Fisher exact test).

doi:10.1371/journal.pntd.0003727.t003

The limits of the screen and treat strategy

Up to now, HAT has relied heavily on the screen and treat strategy where at risk populations are visited by mobile medical teams, using the CATT as the mass screening test and treating microscopically confirmed HAT patients. Although this strategy has proven very efficient in lowering disease prevalence and has saved thousands lives, it may not be sufficient when the objective is the elimination of the disease from a focus. The existence of human asymptomatic carriers in Guinea has been reported [19] and is also suggested here by the detection of a number of individuals displaying *T. b. gambiense* specific antibodies but negative parasitological results. It is noteworthy that in Boffa West where only the screen and treat strategy was applied, we did not observe any significant decrease in HAT prevalence between 2012 and 2013 despite a population coverage estimated to be around 70%. Instead, a high incidence of new infection events (>1%) was observed in the population who tested CATT negative in 2012. This illustrates that a sufficient number of infected hosts remained in the area at the end of the 2012 survey to infect tsetse flies. In this context, a high number of costly screening rounds would probably be required to bring HAT under effective control. The fact that population coverage tends to decrease following repeated medical surveys (due to population fatigue) is a known phenomenon reported from a number of countries including the Democratic Republic of Congo [20] and should be taken into account in planning HAT elimination strategies.

Adding vector control significantly increases the efficacy of medical surveys to lower transmission levels

In sharp contrast to the situation described above and despite lower population coverage, HAT prevalence was reduced by a magnitude of three (from 0.3 to 0.1%) on the Eastern bank of the focus where insecticide-impregnated targets were deployed. Furthermore, the fact that only two new infection events were detected amongst 2,777 individuals testing negative to the CATT in 2012 (incidence = 0.007) indicates that *T.b. gambiense* transmission had fallen to very low levels in this area. More importantly, this sharp effect was associated with a reduction of tsetse densities of only 80%, indicating that partial vector control, combined with active screening, significantly impacts on parasite transmission and speeds up the elimination process. Because mangroves represent probably one of the most challenging environments for vector control as large areas are not accessible, impregnated targets were mainly deployed to limit exposure in areas where the population is highly exposed to tsetse bites and thus to decrease

the risk of being infected or to infect tsetse flies. Analysis of the antibody response to a tsetse saliva specific epitope (Tsgf) in the population of sentinel villages from the vector control area accordingly demonstrated a significant decrease of antibody titers just one year after initial target deployment. Although an important proportion of inhabitants still exhibited intermediate antibody titers in 2013 indicating that they were probably still exposed to tsetse flies, the proportion of high responders dropped sharply from 25% to less than 4% suggesting that intense exposure to tsetse bites had been strongly reduced in the population. A high level of human tsetse contacts thus appears crucial for *T. b. gambiense* transmission, a condition that would appear to have been reduced by the deployment of insecticide-impregnated targets on the eastern bank of the Boffa focus.

Targeting areas of human tsetse contacts to reduce the level of human exposure to tsetse flies thus appear an efficient tool to use in combination with the screen and treat strategy, especially where human populations are highly exposed to tsetse flies. During this two year intervention, 12,000 impregnated targets were used. Compared to the total population living in the area, this represents less than a target/inhabitant. In addition, targets are easy to set-up and deployment in areas of human activities could be transferred to the local communities with minimum intervention from the central level in order to secure vector control sustainability. How long such measures should be maintained in a given focus remains an open question but will critically depend on the existence of other nearby foci from where infected hosts could migrate. Such approaches combining vector and medical control could be applied in other biotopes where they could prove even more effective. The next place where such vector control operation will be undertaken in addition to the medical approach is of course Boffa West.

Supporting Information

S1 Fig. Map showing the distribution of insecticide impregnated targets deployed in the Boffa focus.

(TIF)

S1 Text. Illustrated description of target deployment (A-) and entomological monitoring of tsetse densities (B-) in the Boffa HAT focus.

(DOCX)

Acknowledgments

We sincerely thank the Ministry of Health and the Direction of Public Health of the Republic of Guinea for their invaluable support. We thank the joint technical staff from Guinea and CIRDES, and the local authorities in Boffa.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: FC MC JBR MJL SJT PS VJ BB. Performed the experiments: FC MC JBR MK ED OC IST JR MP MBS ML VJ BB. Analyzed the data: FC MC JBR PS VJ BB. Wrote the paper: FC MC JBR MJL SJT PS VJ BB.

References

1. Holmes P. First WHO meeting stakeholders on elimination of gambiense human African trypanosomiasis. Plos Negl Trop Dis. 2014; 8: e3244. doi: [10.1371/journal.pntd.0003244](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003244) PMID: [25340404](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25340404/)
2. WHO Control and surveillance of human African trypanosomiasis. Report of a WHO expert Committee. WHO Technical Report Series. 2013; n°984: 237 p.

3. Simarro PP, Franco J, Diarra A, Postigo JA, Jannin J. Update on field use of the available drugs for the chemotherapy of human African trypanosomiasis. *Parasitology*. 2012; 139: 842–846. doi: [10.1017/S0031182012000169](https://doi.org/10.1017/S0031182012000169) PMID: [22309684](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22309684/)
4. Bucheton B, MacLeod A, Jamonneau V. Human host determinants influencing the outcome of *Trypanosoma brucei gambiense* infections. *Parasite Immunol*. 2011; 33: 438–447. doi: [10.1111/j.1365-3024.2011.01287.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2011.01287.x) PMID: [21385185](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21385185/)
5. Welburn S, Maudlin I. Priorities for the elimination of sleeping sickness. *Adv Parasitol*. 2012; 79: 299–337. doi: [10.1016/B978-0-12-398457-9.00004-4](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398457-9.00004-4) PMID: [22726645](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22726645/)
6. Solano P, Torr SJ, Lehane MJ. (2013) Is vector control needed to eliminate gambiense human African trypanosomiasis? *Front Cell Infect Microbiol*. 2013; 3(33).
7. Rayaisse JB, Esterhuizen J, Tirados I, Kaba D, Salou E, et al. Towards an Optimal Design of Target for Tsetse Control: Comparisons of Novel Targets for the Control of Palpalis Group Tsetse in West Africa. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011; 5(9): e1332. doi: [10.1371/journal.pntd.0001332](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001332) PMID: [21949896](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21949896/)
8. Esterhuizen J, Rayaisse JB, Tirados I, Mpiana S, Solano P, et al. Improving the Cost-Effectiveness of Visual Devices for the Control of Riverine Tsetse Flies, the Major Vectors of Human African Trypanosomiasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011; 5(8): e1257. doi: [10.1371/journal.pntd.0001257](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001257) PMID: [21829743](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21829743/)
9. Kagbadouno MS, Camara M, Rouamba J, Rayaisse JB, Traoré IS, et al. Epidemiology of Sleeping Sickness in Boffa (Guinea): Where Are the Trypanosomes? *PLoS Negl Trop Dis*. 2012; 6(12): e1949. doi: [10.1371/journal.pntd.0001949](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001949) PMID: [23272259](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23272259/)
10. Magnus E, Vervoort T, Van Meirvenne N. A card-agglutination test with stained trypanosomes (C.A.T.T.) for the serological diagnosis of *T. b. gambiense* trypanosomiasis. *Ann Soc Belg Med Trop*. 1978; 58: 169–176. PMID: [747425](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/747425/)
11. Camara M, Camara O, Ilboudo H, Sakande H, Kaboré J, et al. Sleeping sickness diagnosis: use of buffy coats improves the sensitivity of the mini anion exchange centrifugation test. *Trop Med Int Health*. 2010; 15: 796–799. doi: [10.1111/j.1365-3156.2010.02546.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2010.02546.x) PMID: [20497407](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20497407/)
12. Van Meirvenne N, Magnus E, Büscher P. Evaluation of variant specific trypanolysis tests for serodiagnosis of human infections with *Trypanosoma brucei gambiense*. *Acta Trop*. 1985; 60: 189–199.
13. Jamonneau V, Bucheton B, Kaboré J, Ilboudo H, Camara O, et al. Revisiting the immune trypanolysis test to optimise epidemiological surveillance and control of sleeping sickness in West Africa. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010; 4(12): e917. doi: [10.1371/journal.pntd.0000917](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000917) PMID: [21200417](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21200417/)
14. Dama E, Cornélie S, Somda MB, Camara M, Kambiré R, et al. Identification of *Glossina palpalis gambiense* specific salivary antigens: towards the development of a serologic biomarker of human exposure to tsetse flies in West Africa. *Microbes Infect*. 2013; 15: 416–427. doi: [10.1016/j.micinf.2013.03.001](https://doi.org/10.1016/j.micinf.2013.03.001) PMID: [23500186](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23500186/)
15. Somda MB, Bengaly Z, Dama E, Poinssignon A, Dayo GK, et al. First insights into the cattle serological response to tsetse salivary antigens: A promising direct biomarker of exposure to tsetse bites. *Vet parasitol*. 2013; 197: 332–40. doi: [10.1016/j.vetpar.2013.05.018](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.05.018) PMID: [23800781](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23800781/)
16. Dama E, Cornélie S, Camara M, Somda MB, Poinssignon A, et al. *In Silico* Identification of a Candidate Synthetic Peptide (Tsgf1_{18–43}) to Monitor Human Exposure to Tsetse Flies in West Africa. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; 7(9): e2455. doi: [10.1371/journal.pntd.0002455](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002455) PMID: [24086785](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24086785/)
17. Laveissière C, Sané B, Méda AH. Measurement of risk in endemic areas of human African trypanosomiasis in Côte d'Ivoire. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1994; 88: 645–648. PMID: [7886756](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7886756/)
18. Courtin F, Jamonneau V, Camara M, Camara O, Coulibaly B et al. A geographical approach to identify sleeping sickness risk factors in a mangrove ecosystem. *Trop Med Int Health*. 2010; 15: 881–889. doi: [10.1111/j.1365-3156.2010.02559.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2010.02559.x) PMID: [20545924](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20545924/)
19. Ilboudo H, Jamonneau V, Camara M, Camara O, Dama E, et al. Diversity of response to *Trypanosoma brucei gambiense* infections in the Forécariah mangrove focus (Guinea): perspectives for a better control of sleeping sickness. *Microbes Infect*. 2011; 13: 943–952. doi: [10.1016/j.micinf.2011.05.007](https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.05.007) PMID: [21658462](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21658462/)
20. Robays J, Bilengue MM, Van der Stuyft P, Boelaert M. The effectiveness of active population screening and treatment for sleeping sickness control in the Democratic Republic of Congo. *Trop Med Int Health*. 2004; 9: 542–550. PMID: [15117297](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15117297/)

Annexe 4

Jamonneau, V., O. Camara, H. Ilboudo, M. Peylhard, M. Koffi, H. Sakande, L. N'Dri, D. Sanou, E. Dama, M. Camara and V. Lejon (2015). "Accuracy of individual rapid tests for serodiagnosis of gambiense sleeping sickness in West Africa." PLoS Negl Trop Dis **9**(2): e0003480.

RESEARCH ARTICLE

Accuracy of Individual Rapid Tests for Serodiagnosis of *Gambiense* Sleeping Sickness in West Africa

Vincent Jamonneau^{1,2}, Oumou Camara³, Hamidou Ilboudo¹, Moana Peylhard^{1,2}, Mathurin Koffi⁴, Hassane Sakande¹, Louis N'Dri⁵, Djénéba Sanou¹, Emilie Dama¹, Mamadou Camara³, Veerle Lejon^{2*}

1 Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zones Subhumide (CIRDES), Bobo-Dioulasso, Burkina Faso, **2** Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Unité Mixte de Recherche IRD-CIRAD 177, Montpellier, France, **3** Programme National de Lutte contre la Trypanosomose Humaine Africaine, Conakry, Guinea, **4** Université Jean Lorougnon GUEDE (UJLoG), UFR Environnement, Laboratoire des Interactions Hôte-Microorganismes-Environnement et Evolution (LIHME), Daloa, Côte d'Ivoire, **5** Institut Pierre Richet (IPR), Unité de Recherche « Trypanosomoses », Bouaké, Côte d'Ivoire

* veerle.lejon@ird.fr



Abstract

Background

Individual rapid tests for serodiagnosis (RDT) of human African trypanosomiasis (HAT) are particularly suited for passive screening and surveillance. However, so far, no large scale evaluation of RDTs has been performed for diagnosis of *Trypanosoma brucei gambiense* HAT in West Africa. The objective of this study was to assess the diagnostic accuracy of 2 commercial HAT-RDTs on stored plasma samples from West Africa.

Methodology/Principal findings

SD Bioline HAT and HAT Sero-K-Set were performed on 722 plasma samples originating from Guinea and Côte d'Ivoire, including 231 parasitologically confirmed HAT patients, 257 healthy controls, and 234 unconfirmed individuals whose blood tested antibody positive in the card agglutination test but negative by parasitological tests. Immune trypanolysis was performed as a reference test for trypanosome specific antibody presence. Sensitivities in HAT patients were respectively 99.6% for SD Bioline HAT, and 99.1% for HAT Sero-K-Set, specificities in healthy controls were respectively 87.9% and 88.3%. Considering combined positivity in both RDTs, increased the specificity significantly ($p \leq 0.0003$) to 93.4%, while 98.7% sensitivity was maintained. Specificities in controls were 98.7–99.6% for the combination of one or two RDTs with trypanolysis, maintaining a sensitivity of at least 98.1%.

Conclusions/Significance

The observed specificity of the single RDTs was relatively low. Serial application of SD Bioline HAT and HAT Sero-K-Set might offer superior specificity compared to a single RDT,

OPEN ACCESS

Citation: Jamonneau V, Camara O, Ilboudo H, Peylhard M, Koffi M, Sakande H, et al. (2015) Accuracy of Individual Rapid Tests for Serodiagnosis of *Gambiense* Sleeping Sickness in West Africa. PLoS Negl Trop Dis 9(2): e0003480. doi:10.1371/journal.pntd.0003480

Editor: Philippe Büscher, Institute of Tropical Medicine, BELGIUM

Received: October 15, 2014

Accepted: December 15, 2014

Published: February 2, 2015

Copyright: © 2015 Jamonneau et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: The authors received no specific funding for this work.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

maintaining high sensitivity. The combination of one or two RDTs with trypanolysis seems promising for HAT surveillance.

Author Summary

Screening for *gambiense* human African trypanosomiasis (HAT) or sleeping sickness is traditionally based on detection of trypanosome specific antibodies in blood. Whereas the card agglutination test is particularly suited for mass screening, individual rapid serodiagnostic tests (RDTs) are rather adapted for use in peripheral health-care centres. Two RDTs have been commercialized recently, and we assessed their diagnostic accuracy on stored plasma samples from West Africa. Immune trypanolysis was performed as a laboratory reference test for antibody presence. Although sensitivity for serodiagnosis of HAT in West Africa was high for both RDTs, their specificity was only 88%. Taking into account the high number of false positive test results, combined seropositivity in both RDTs was considered, raising specificity to 93%. Serial application of two RDTs should therefore be considered as an option for passive case finding, especially in settings with low HAT prevalence. A combination of one or two RDTs with immune trypanolysis further improved specificity for HAT to 99%, while maintaining sensitivity at 99% and seems promising for HAT surveillance.

Introduction

Human African trypanosomiasis (HAT) or sleeping sickness is a fatal parasitic infection affecting rural populations in sub-Saharan Africa. During the last decade, active case finding by specialized mobile teams has considerably contributed to the reduction of the prevalence of HAT caused by *Trypanosoma brucei* (*T.b.*) *gambiense*. Since 2009, the number of cases reported annually has dropped below ten thousand. At low prevalence, cost-effectiveness of active screening decreases and passive case finding becomes increasingly important [1]. This shift from the mobile team to the fixed health system for HAT detection requires an adapted diagnostic approach. Detection of trypanosome specific antibodies in blood with the card agglutination test for trypanosomiasis (CATT), [2] is routinely applied for large scale active population screening. CATT is however ill-adapted to the conditions encountered in health-care centers. The limited shelf-life of the reconstituted CATT reagent at ambient temperature leads to considerable reagent loss when only few tests are performed per day. Another limitation of the CATT is the need of an agitator and a cold chain and therefore electric power, which are not always available in rural health-care centers.

The venue of individual rapid tests for serodiagnosis of HAT that are stable at ambient temperature and can be performed without additional material [3–5], is a key event in the development of an effective passive screening and HAT surveillance system [6]. Two rapid diagnostic tests (RDT) have been evaluated in phase 2 diagnostic trials [5, 7], show sufficient diagnostic accuracy and have been commercialized. So far, all RDT diagnostic evaluations have been performed on samples originating from Central-Africa, and no large scale evaluation has been performed for diagnosis of *gambiense* HAT in West Africa, while geographic variation in the accuracy of HAT serodiagnostic tests may occur [8].

The objective of this study was therefore to assess the diagnostic accuracy of 2 RDTs on stored plasma samples collected from HAT cases, negative controls, and serological suspects originating from Guinea and Côte d'Ivoire, two countries where HAT transmission is still active [9, 10].

Materials and Methods

Ethical statement

Samples were collected during medical surveys conducted by the national HAT control programs. All participants were informed about the study objectives in their own language and gave written informed consent. Children less than 12 years old were excluded. For participants between 12 and 18 years old, informed consent was obtained from the parents. Approval for this study was obtained from the consultative committee for deontology and ethics (Comité Consultatif de Déontologie et d'Ethique) of the Institut de Recherche pour le Développement. In Côte d'Ivoire, the protocol was approved by the national ethical committee (N°0308/MSLS/CNER-P).

Origin of test samples

Plasma samples originated from subjects identified during active screening campaigns in the Dubreka, Boffa and Forecariah coastal mangrove HAT foci, situated north of Conakry in the Republic of Guinea and in the HAT foci of Oumé, Bouaflé, Sinfra, and Bonon in western central Côte d'Ivoire. All subjects underwent CATT/*T.b. gambiense* performed on whole blood (CATT-WB). Blood was collected in heparinised tubes and for CATT WB-positive persons, the plasma end titre was determined. All CATT-pl $\geq 1/4$ positive persons underwent parasitological examination by direct microscopic examination of the lymph node aspirate if swollen lymph nodes were present and/or mini-anion exchange centrifugation technique on buffy coat (mAECT-BC) [11]. Based on the CATT and parasitological result, four categories of study participants (n = 722) were defined: 1° HAT: Parasitologically confirmed HAT patients with positive CATT-WB and CATT-pl end titer $\geq 1/4$ (n = 229 from Guinea, n = 2 from Côte d'Ivoire); 2° Control: CATT-WB negative individuals for whom there was no suspicion for sleeping sickness infection (n = 101 from Guinea and n = 156 from Côte d'Ivoire); 3° SERO: Individuals with positive CATT-WB and CATT-pl end titer $\geq 1/4$ (Seropositives) but no parasites detected (n = 123 from Guinea, n = 42 from Côte d'Ivoire); 4° SUSP: Individuals with positive CATT-WB but CATT-pl $< 1/4$ (Suspects) in whom parasitological examinations were not performed (n = 69 from Côte d'Ivoire).

RDT test procedure

Samples were retrospectively tested in two commercial RDTs for serodiagnosis of gambiense HAT: SD Bioline HAT (SD Diagnostics, Korea) and HAT Sero-K-Set (Coris BioConcept, Belgium). Both tests use purified native variant surface glycoproteins of *T.b. gambiense* variable antigen types LiTat 1.3 and 1.5 as antigens: SD Bioline HAT in two separate test lines (line 1 and 2 respectively), HAT Sero-K-Set in a single test line consisting of a mix of both glycoproteins.

The methodology applied was previously described for evaluation of RDTs for malaria diagnosis [12]. Tests were performed according to the indications of the manufacturers. Briefly, for SD Bioline HAT, 10 μ l of test plasma were applied in the sample well, followed by 4 drops of assay diluent. For HAT Sero-K-Set, 15 μ l of plasma were applied in the sample well, followed by 2 drops of BL-A buffer, after which the test device was re-inserted into its pouch. Tests were performed in batches of 10. Reading was done in day light, 15 minutes after application of the buffer. In case the control line did not appear, the test result was considered invalid. A scoring system was used for estimating the individual test line intensity: negative (no visible test line), faint (barely visible test line), weak (test line weaker than the control line), medium (test line equivalent to the control line) or strong (test line more intense than the control line) [13]. Reading was performed by 3 independent readers that were blind to other results

(2 experienced and 1 less experienced that had been trained). The consensus test line intensity was based on consensus between two readers. In absence of consensus (3 different scores), the median score was taken. The test line was interpreted positive if the consensus test line intensity was faint or stronger. The HAT Sero-K-Set was positive if the test line was positive, the SD Bioline HAT was considered as positive if at least 1 test line was read as positive.

Immune trypanolysis

For immune trypanolysis [14, 15], 25 μ l of plasma were mixed with 25 μ l of guinea pig serum and incubated for 30 minutes at room temperature. Blood of mice infected with *T.b. gambiense* was diluted in guinea pig serum to a final concentration of 10^7 trypanosomes/ml. 50 μ l of this trypanosome suspension were added. After 90 min of incubation at room temperature, the suspension was examined microscopically at 400x magnification. Trypanolysis was considered positive when 50–100% of the trypanosomes were lysed, otherwise it was considered negative. Two trypanolysis series were run, one with *T.b. gambiense* variable antigen type LiTat 1.3 and one with LiTat 1.5. A sample was considered positive in trypanolysis if it was positive with at least 1 variable antigen type.

Analysis of results

Diagnostic sensitivity and specificity with binomial exact 95% confidence intervals (CI) were calculated for the results obtained in respectively the HAT and control group. Specificities and sensitivities were compared using the McNemar chi-square test. Differences between independent groups were assessed using a Chi squared test. Taking into account that the SERO and SUSP group are heterogeneous and might contain individuals that (i) are or have been in contact with *T.b. gambiense* but did not have detectable parasitemia, or (ii) are CATT false positives [16], immune trypanolysis was used as a reference test for presence of *T.b. gambiense* specific antibodies [15].

Results

Scoring of the RDT test line intensities; variability between readers

For both RDTs, not a single invalid RDT result was observed. The line intensities scored by the 3 readers as well as the consensus intensity are shown in Table 1. In HAT Sero-K-Set, the consensus test line intensity was negative for 370 persons, and faint to strong for 352 persons whom were considered positive. Absence of a consensus intensity or differences between individual scores larger than one grade occurred in 1.4% of readings (10/722). The kappa values for a positive or negative test result, when comparing each of the readers, were between 94.2 and 95.8%. The consensus test line intensity in SD Bioline HAT line 1 and 2 were respectively 362 and 363 times negative and 360 and 359 times positive. In respectively 3.8% (28/722) and 1.7% (12/722) of readings of line 1 and 2, at least one reader scored more than 1 grade different than another reader. At least 1 of both test lines scored positive in SD Bioline HAT for 396 persons. Kappas between readers were 91.7–95.0% for line 1, and 92.8–94.5% for line 2.

Test result by participant category and diagnostic sensitivity and specificity

The number and proportion of positive test results by study participant category are summarized in Table 2. Sensitivities observed in HAT patients were respectively 99.6% (CI 97.6–100) for SD Bioline HAT, and 99.1% (CI 96.9–99.9) for HAT Sero-K-Set. There was no difference in sensitivity ($p = 0.6$) between the 2 RDTs. Specificities in healthy controls were respectively

Table 1. Consensus intensity and intensity scores given by 3 readers to the test lines in HAT Sero-K-Set and SD Bioline HAT (line 1 and 2).

	Score 2 readers	3 rd reader					Other intensity score combinations
		N	F	W	M	S	
HAT Sero-K-Set consensus intensity							
N (n = 370)	N N	356	12		1	1	-
F (n = 14)	F F	8	1	4	0	0	N F W (n = 1)
W (n = 28)	W W	1	8	10	9	0	-
M (n = 96)	M M	2	0	14	44	35	W M S (n = 1)
S (n = 214)	S S	0	0	3	42	169	-
SD Bioline HAT line 1 consensus intensity							
N (n = 362)	N N	346	15	1	0	0	-
F (n = 45)	F F	16	18	11	0	0	-
W (n = 150)	W W	1	18	92	38	1	-
M (n = 72)	M M	0	0	22	10	18	W M S (n = 22)
S (n = 93)	S S	0	0	3	4	86	-
SD Bioline HAT line 2 consensus intensity							
N (n = 363)	N N	348	14	1	0	0	-
F (n = 47)	F F	15	21	10	0	0	N F W (n = 1)
W (n = 228)	W W	2	18	161	44	2	F W M (n = 1)
M (n = 65)	M M	1	0	34	17	9	W M S (n = 4)
S (n = 19)	S S	0	0	0	11	8	-

In case of a negative (N) consensus intensity the test line intensity was considered negative, the test line was interpreted positive if the consensus test line intensity was faint or stronger. N: negative, F: faint, W: weak, M: Medium, S: strong.

doi:10.1371/journal.pntd.0003480.t001

87.9% (CI 83.3–91.7) for SD Bioline HAT and 88.3% (CI 83.8–92.0) for HAT Sero-K-Set. There was no difference in specificity between the lines 1 and 2 in SD Bioline HAT ($p = 0.2$), nor was there any difference in specificity between the 2 RDTs ($p = 0.8$). HAT Sero-K-Set was slightly more specific ($p = 0.04$) on samples from Côte d'Ivoire (91.7%, CI 86.2–95.5) than those from Guinea (83.2, CI 74.4–89.9), while no difference was observed with SD Bioline HAT ($p = 0.7$).

Considering combined positivity in both SD Bioline HAT and HAT Sero-K-Set, increased the specificity significantly to 93.4% (CI 89.6–96.1) compared to the single RDTs ($p \leq 0.0003$), while high sensitivity was maintained ($p > 0.16$).

Sensitivity and specificity of immune trypanolysis were respectively 100% (CI 98.4–100) and 95.7% (CI 92.5–97.8). Immune trypanolysis was significantly more specific than SD Bioline HAT and HAT Sero-K-Set ($p < 0.0009$). However, no significant difference in specificity

Table 2. Number of positive test results by type of study participant.

Category	SD Bioline HAT	HAT Sero-K-Set	SD Bioline HAT + HAT Sero-K-Set	Immune trypanolysis
HAT (n = 231)	230 (99.6%)	229 (99.1%)	228 (98.7%)	231 (100%)
Control (n = 257)	31 (12.1%)	30 (11.7%)	17 (6.6%)	11 (4.3%)
SERO (n = 165)	107 (64.8%)	84 (50.9%)	79 (47.9%)	77 (46.7%)
SUSP (n = 69)	28 (40.6%)	9 (13.0%)	7 (10.1%)	3 (4.3%)
Total (n = 722)	396 (54.8%)	352 (48.8%)	331 (45.8%)	322 (44.6%)

doi:10.1371/journal.pntd.0003480.t002

Table 3. Reactivity of individual test lines in SD Bioline HAT in function of trypanolysis results of the corresponding *T.b. gambiense* variable antigen type.

SD Bioline HAT	TL LiTat 1.3		SD Bioline HAT	TL LiTat 1.5	
	Negative	Positive		Negative	Positive
Line 1 negative	326	36	Line 2 negative	343	20
Line 1 positive	78	282	Line 2 positive	73	286

doi:10.1371/journal.pntd.0003480.t003

could be observed between immune trypanolysis and the combination of SD Bioline HAT with HAT Sero-K-Set ($p = 0.2$).

In SD Bioline HAT, respectively 64.6% of SERO and 40.6% of SUSP tested positive. These percentages were respectively 50.9 and 13.0% for HAT Sero-K-Set, and respectively 47.9 and 10.1% for the combination of the 2 RDTs (Table 2). In immune trypanolysis, respectively 46.7 and 4.3% of SERO and SUSP were positive. Thus, significantly more SERO tested RDT or trypanolysis positive than SUSP ($p \leq 0.001$). With HAT Sero-K-Set or trypanolysis a similar proportion of SUSP and controls were positive ($p \geq 0.1$), while significantly more SUSP than controls tested positive in SD Bioline HAT ($p < 0.001$).

Presence of *T.b. gambiense* specific antibodies

Immune trypanolysis is considered to be the reference test for presence of trypanosome specific antibodies and *T.b. gambiense* contact. SD Bioline HAT and HAT Sero-K-Set were positive in respectively 93.5% (301/322, CI 90.2–95.9) and 94.4% (304/322, CI 91.3–96.7) of immune trypanolysis positive persons. In immune trypanolysis positives, there was no significant difference between both RDTs in number of positives ($p = 0.4$).

In immune trypanolysis negative persons, respectively 76.3% (305/400, CI 71.8–80.3) and 88.0% (352/400, CI 84.4–91.0) were negative in SD Bioline HAT and HAT Sero-K-Set. In this group, HAT Sero-K-Set was significantly more negative than SD Bioline HAT ($p < 0.0001$).

Table 3 shows test line 1 and test line 2 results for SD Bioline HAT compared to trypanolysis with the corresponding variable antigen type, respectively LiTat 1.3 and LiTat 1.5. In SD Bioline HAT, line 1 and 2 were significantly more positive than the corresponding variable antigen type in immune trypanolysis ($p \leq 0.0001$). Among the samples that were trypanolysis negative for both LiTat 1.3 and LiTat 1.5, there was no significant difference in test line 1 or 2 positivity, nor was there in trypanolysis positive samples (p values of 0.2).

RDT combined with immune trypanolysis, by participant category

Table 4 shows the number of positives in one or both RDTs combined with trypanolysis, considering only those subjects positive that are positive in all individual tests. Sensitivities in HAT patients were respectively 99.6% (CI 97.6–100) for the combination SD Bioline HAT and trypanolysis, 99.1% (CI 96.9–99.9) for HAT Sero-K-Set combined with trypanolysis, and 98.7% (CI 96.3–99.7) for the combination of the 2 RDTs with trypanolysis. There was no difference in sensitivity between the 3 different test combinations ($p > 0.2$). Specificities in controls were respectively 98.8% (CI 96.6–99.8) for the combination SD Bioline HAT and trypanolysis, 98.1% (CI 95.5–99.4) for HAT Sero-K-Set combined with trypanolysis, and 99.2% (CI 97.2–99.9) for the combination of the 2 RDTs with trypanolysis. No significant differences were observed between the specificities of the different test combinations ($p > 0.08$). However, the combination of one or 2 RDTs with immune trypanolysis was more specific than one or 2 RDTs without immune trypanolysis ($p < 0.005$).

The combination of one or two RDTs with trypanolysis was positive in 38.2–41.2% of SERO, 2.9% of SUSP (Table 4). Again, significantly more SERO tested positive than SUSP ($p \leq 0.001$), while a similar proportion of SUSP and controls were positive ($p \geq 0.6$).

Discussion

This is the first study to report on HAT diagnostic accuracy on a large number of samples originating from West Africa, and also the first to perform both commercially available RDTs for serodiagnosis of HAT on the same sample set. Although sensitivity of the two tested RDTs for serodiagnosis of HAT in West Africa was high, specificity remained limited to 88%. Specificity significantly increased to 93% considering combined seropositivity in both RDTs. Using a combination of one or two RDTs with trypanolysis further improved specificity to 99% while maintaining sensitivity at 99%.

For interpretation of the results, a selection bias caused by routine screening of the population at risk using the CATT test should be taken into account. This could result in an overestimation of test sensitivity and specificity, as CATT consists of whole fixed and stained trypanosomes of the LiTat 1.3 variable antigen type and the corresponding purified native VSG is one of the two antigens used in both RDTs as well. Furthermore the evaluation was done on stored plasma samples and not on fresh whole blood. We cannot exclude that this could influence the test results, although antibodies are well conserved after freezing. Subjectivity of scoring of the RDT test result was largely eliminated by the use of 3 independent readers. Absence of a consensus intensity or the occurrence of large differences between scores, were not frequent but can be explained by a non-uniform coloration of the test line.

The RDT specificities around 88% observed in this study are close to the 87% specificity mentioned in the SD Bioline HAT test instructions (version 53FK10–04-En-0) but below the previously observed specificities of 98.6% for HAT-Sero-K-Set [7] and of 94.6% for a SD Bioline HAT prototype [5]. Specificity of both RDTs was also below the 98.7% specificity of CATT on whole blood previously reported in West Africa [15]. Possible explanations could be regional differences [8], cross reaction with other infections or superior challenge by animal trypanosomes to cause false positive reactions [15], or other.

Although immune trypanolysis has been considered 100% specific for HAT [15], 4.3% of controls tested positive. It is not clear if this is due to false positivity, if previously treated HAT cases who did not declare themselves were included as controls, or if they were trypanotolerant individuals who became negative in CATT but remained immune trypanolysis positive [17]. The phenomenon of immune trypanolysis positive, CATT negative healthy controls requires further examination.

Taking into account the high number of false positive test results observed, we examined the possible performance of combined positivity in both RDTs for diagnosis of HAT, taking

Table 4. Number of positive test results combining RDTs with trypanolysis, by type of study participant.

Category	SD Bioline HAT + TL	HAT Sero-K-Set + TL	SD Bioline HAT + HAT Sero-K-Set + TL
HAT (n = 231)	230 (99.6%)	229 (99.1%)	228 (98.7%)
Control (n = 257)	3 (1.2%)	5 (1.9%)	2 (0.8%)
SERO (n = 165)	66 (40.0%)	68 (41.2%)	63 (38.2%)
SUSP (n = 69)	2 (2.9%)	2 (2.9%)	2 (2.9%)
Total (n = 722)	301 (41.9%)	304 (42.1%)	295 (40.9%)

doi:10.1371/journal.pntd.0003480.t004

the example of the strategy of serial testing applied with RDTs for diagnosis of HIV [18]. Although both RDTs actually available for serodiagnosis of HAT are based on identical antigens, considering combined positivity significantly increased specificity and reduced the number of false positives by almost half. Serial application of SD Bioline HAT and HAT Sero-K-Set could therefore be considered as an option for passive case finding, as long as no second generation RDTs for serodiagnosis of HAT are available based on different antigens. However, as the combined specificity of 93.4% is still suboptimal, the local context, on-site availability of parasitological confirmation tests and the relative cost should be taken into account when deciding on test algorithms.

For surveillance of HAT, RDTs are actually being implemented in fixed health centres. In case of clinical suspicion and a positive RDT, and depending on the experience of the health centres in HAT diagnosis, local prevalence, and availability of sensitive confirmation diagnostic tests, blood on filter paper is sampled and sent to a reference centre for immune trypanolysis, either directly, or after unsuccessful parasitological examination. Those persons with a trypanolysis positive result are considered at high suspicion for infection, should be (re-)examined parasitologically and followed-up closely. Although in this study stored plasma samples were used for immune trypanolysis instead of filter paper, our results show the potential high diagnostic accuracy of a combined RDT-trypanolysis approach. In the final result no difference in accuracy occurred when combining one or two RDTs followed by trypanolysis. However, the serial application of two RDTs may present considerable advantages. The number of unnecessary parasitological examinations may be significantly reduced as well as the number of filter papers to be dispatched and tested in trypanolysis. Use of filter paper instead of plasma for immune trypanolysis, may further decrease of the number of trypanolysis positive SERO and SUSP individuals [19] thus further decrease the number of people to be followed up.

Our data suggest that the specificity of actual RDTs for serodiagnosis of HAT might be lower than expected. Care should therefore be taken in interpretation of the result, especially since the future use of RDTs alone, without parasitological confirmation, for patient management has already been suggested [20]. Serological screening using serial application of SD Bioline HAT and HAT Sero-K-Set might offer superior specificity compared to a single RDT, maintaining high sensitivity. The combination of one or two RDTs with trypanolysis seems promising for HAT surveillance. However, the diagnostic accuracy and especially the specificity of applying a combination of RDTs on fresh blood for HAT diagnosis, without prior CATT selection, remains to be determined as well as their combination with trypanolysis on filter paper, not only in West Africa but also in Central Africa.

Supporting Information

S1 Checklist. STARD checklist.
(DOCX)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: VJ HI ED VL. Performed the experiments: MP HS LND DS ED. Analyzed the data: VJ HI HS VL. Contributed reagents/materials/analysis tools: OC MK MC. Wrote the paper: VJ OC HI MP MK HS LND DS ED MC VL.

References

1. Franco JR, Simarro PP, Diarra A, Ruiz Postigo JA, Jannin JG (2014) The journey towards elimination of gambiense human African trypanosomiasis: not far, nor easy. *Parasitology* 1–13.

2. Magnus E, Vervoort T, Van Meirvenne N (1978) A card-agglutination test with stained trypanosomes (C.A.T.T.) for the serological diagnosis of *T.b.gambiense* trypanosomiasis. *Ann Soc Belg Méd Trop* 58: 169–176. PMID: [747425](#)
3. Sullivan L, Wall SJ, Carrington M, Ferguson MAJ (2013) Proteomic selection of immunodiagnostic antigens for human African trypanosomiasis and generation of a prototype lateral flow immunodiagnostic device. *PLoS Negl Trop Dis* 7: e2087. doi: [10.1371/journal.pntd.0002087](#) PMID: [23469310](#)
4. Büscher P, Gilman Q, Lejon V (2013) Novel rapid diagnostic test for sleeping sickness. *N Engl J Med* 368: 1069–1070. doi: [10.1056/NEJMc1210373](#) PMID: [23484849](#)
5. Lumbala C, Bissler S, Nguertoum E, Flevaud L, Jacquet D, et al. (2013) Development and evaluation of a rapid screening test for sleeping sickness. *Annales Africaines de Médecine* 6, Suppl. 1: 49.
6. Jamonneau V, Bucheton B (2014) The challenge of serodiagnosis of sleeping sickness in the context of elimination. *Lancet Glob Health* 2: e306–e307. doi: [10.1016/S2214-109X\(14\)70226-8](#) PMID: [25103289](#)
7. Büscher P, Mertens P, Leclipteux T, Gilman Q, Jacquet D, et al. (2014) Sensitivity and specificity of HAT Sero-K-SeT, a rapid diagnostic test for serodiagnosis of sleeping sickness caused by *Trypanosoma brucei gambiense*: a case-control study. *The Lancet Global Health*.
8. Truc P, Lejon V, Magnus E, Jamonneau V, Nangouma A, et al. (2002) Evaluation of the micro-CATT, CATT/*Trypanosoma brucei gambiense*, and LATEX/T b *gambiense* methods for serodiagnosis and surveillance of human African trypanosomiasis in West and Central Africa. *Bull World Health Organ* 80: 882–886. S0042–96862002001100008 [pii]. PMID: [12481210](#)
9. Simarro P, Cecchi G, Paone M, Franco JR, Diarra A, et al. (2010) The atlas of human African trypanosomiasis: a contribution to global mapping of neglected tropical diseases. *Int J Health Geogr* 9: 57. doi: [10.1186/1476-072X-9-57](#) PMID: [21040555](#)
10. World Health Organization (2013) Control and surveillance of human African trypanosomiasis. 984.
11. Camara M, Camara O, Ilboudo H, Sakande H, Kaboré J et al. (2010) Sleeping sickness diagnosis: use of buffy coats improves the sensitivity of the mini anion exchange centrifugation test. *Trop Med Int Health* 15: 796–799. doi: [10.1111/j.1365-3156.2010.02546.x](#) PMID: [20497407](#)
12. Gillet P, Bosselaers K, Cnops L, Bottieau E, van EM, Jacobs J (2009) Evaluation of the SD FK70 malaria Ag *Plasmodium vivax* rapid diagnostic test in a non-endemic setting. *Malar J* 8: 129. doi: [10.1186/1475-2875-8-129](#) PMID: [19519915](#)
13. Bell DR, Wilson DW, Martin LB (2005) False-positive results of a *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2-detecting malaria rapid diagnostic test due to high sensitivity in a community with fluctuating low parasite density. *Am J Trop Med Hyg* 73: 199–203. PMID: [16014858](#)
14. Van Meirvenne N, Magnus E, Büscher P (1995) Evaluation of variant specific trypanolysis tests for serodiagnosis of human infections with *Trypanosoma brucei gambiense*. *Acta Trop* 60: 189–199. doi: [10.1016/0001-706X\(95\)00127-Z](#) PMID: [8907397](#)
15. Jamonneau V, Bucheton B, Kaboré J, Ilboudo H, Camara O et al. (2010) Revisiting the immune trypanolysis test to optimise epidemiological surveillance and control of sleeping sickness in west Africa. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e917–4.69. doi: [10.1371/journal.pntd.0000917](#) PMID: [21200417](#)
16. Bucheton B, MacLeod A, Jamonneau V (2011) Human host determinants influencing the outcome of *Trypanosoma brucei gambiense* infections. *Parasite Immunol* 33: 438–447. doi: [10.1111/j.1365-3024.2011.01287.x](#) PMID: [21385185](#)
17. Jamonneau V, Ilboudo H, Kaboré J, Kaba D, Koffi M et al. (2012) Untreated infections by *Trypanosoma brucei gambiense* are not 100% fatal. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1691. doi: [10.1371/journal.pntd.0001691](#) PMID: [22720107](#)
18. World Health Organization (2009) HIV antigen/antibody assays: operational characteristics: report 16 rapid assays. Geneva: World Health Organization. 50 p.
19. Camara O, Camara M, Lejon V, Ilboudo H, Sakande H et al. (2014) Immune trypanolysis test with blood spotted on filter paper for epidemiological surveillance of sleeping sickness. *Trop Med Int Health* 19: 828–831. doi: [10.1111/tmi.12316](#) PMID: [24750463](#)
20. Eperon G, Balasegaram M, Potet J, Mowbray C, Valverde O et al. (2014) Treatment options for second stage *gambiense* human African trypanosomiasis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 12:1407–17. doi: [10.1586/14787210.2014.959496](#) PMID: [25204360](#)

Annexe 5

Protocole d'extraction d'ARN à l'aide du kit d'extraction d'ARN Tempus TM Spin (Applied Biosystems, USA)

TEMPUS™ BLOOD RNA TUBE

TEMPUS™ SPIN RNA ISOLATION KIT (APPLIED BIOSYSTEMS)

*Tempus Blood RNA Tube par 50 réf catalog: 4342792

*Tempus Spin RNA Isolation kit 50 preps réf catalog: 4380204

I - Prélèvement

Immédiatement le prélèvement effectué, vortexer ou agiter vigoureusement le tube. Celui-ci est ensuite stocké à la température et pour une durée définies au préalable comme optimales, jusqu'à l'extraction de l'ARN.

II- Extraction ARN

1. Si le prélèvement a été conservé congelé, le laisser décongeler à TA (Température Ambiante).
2. Transvaser le contenu dans un tube 50ml (RNase free). Ajouter 3ml PBS (Phosphate Buffer Saline) pour obtenir 12ml final. Vortexer au moins **30sec vitesse max**.
3. Centrifuger **30min à 4°C à 3000g** (4000rpm sur la Jouan, salle des centrifugeuses)
4. Retirer le surnageant par inversion du tube. Attention le culot ARN est transparent et invisible. Laisser le tube à l'envers sur un papier absorbant pendant **2min**. Essuyer les gouttes le long du tube si besoin.
5. Ajouter 400µl RNA Purification Resuspension solution et vortexer brièvement. (Attention de ne pas entrainer vers le fond du tube les résidus du pourtour)
6. Garder le tube dans la glace jusqu'aux prochaines étapes.
7. Placer la colonne- filtre sur un tube. Mettre 100µl RNA Purification Wash solution1.
8. Transférer l'ARN resuspendu (400µl) dans la colonne –filtre. Centrifuger **30sec à 14000rpm**.
9. Vider le tube collecteur et ajouter 500µl RNA Purification Wash solution1 à la colonne – filtre. Centrifuger **30sec à 14000rpm**.
10. Vider le tube collecteur et ajouter 500µl RNA Purification Wash solution 2 à la colonne – filtre. Centrifuger **1min à 14000rpm**.
11. Vider le tube collecteur et procéder au traitement à la DNase (RNase free) (Qiagen réf catalog : 79254) (10µl DNase (reprise avec 550µl H2O DEPC) + 70µl tampon RDD). Placer les 80µl de ce mélange sur la colonne –filtre. Incuber **15min à TA ou 100µl de la solution Absolute RNA Wash Solution . incuber **15min à TA**.**
12. Ajouter 500µl RNA Purification Wash Solution 2, attendre **5min** et centrifuger **30sec à 14000rpm**.
13. Vider le tube collecteur et ajouter de nouveau 500µl RNA Purification Wash Solution 2. Centrifuger **30sec à 14000rpm**.
14. Vider le tube collecteur et centrifuger **30sec à 14000rpm** pour sécher le filtre.
15. Placer la colonne–filtre sur un nouveau tube collecteur et ajouter 100µl Nucleic Acid purification Elution Solution. Incuber **2min à 70°C** puis centrifuger **30sec à 14000rpm**.
16. Reprendre l'éluat , le refaire passer sur le filtre , centrifuger **2min à 15000rpm**.
17. Prélever 90µl de l'éluat ARN sans pipeter le fond du tube (10µl de déchets) et transvaser dans un nouveau tube RNase free. Stocker à -80°C.

Annexe 6

Rapport RNA-Seq orienté n°4 issu de la plateforme MGX de Montpellier



Rapport RNA-Seq orienté n°4

Sophie Thévenon

Système de management de la qualité certifié ISO9001 :2008

25 juin 2014

Table des matières

1	Description de la manip de séquençage	2
1.1	Procédures expérimentales	2
1.2	Le séquençage	3
2	Pré-traitement informatique	5
3	Description de la manip et résultat	6
3.1	Analyse qualité de la piste contrôle	6
3.1.1	Qualité des séquences par base	7
3.1.2	Qualité des séquences	9
3.1.3	Teneur en base N	10
3.2	Analyse qualité des échantillons	11
3.2.1	Qualité des séquences par base	11
3.2.2	Qualité des séquences	42
3.2.3	Teneur en base N	73
3.2.4	Recherche de contaminants	104
3.3	Résultats du séquençage	121
3.3.1	Nombre de séquences par échantillon sur une piste pour le run 421	121
3.3.2	Nombre de séquences par échantillon sur une piste pour le run 431	124
3.3.3	Nombre de séquences par échantillon sur une piste pour le run 432	126
3.3.4	Nombre de séquences par échantillon en cumulant les 3 runs	129
3.4	Commentaires sur la manip	130
4	Alignement de séquences	131
4.1	Alignement de séquences TopHat2 - Single-read 50	131
4.1.1	Visualisation de l'alignement	133
4.2	Comptage avec HTSeq-count	134

1 Description de la manip de séquençage

1.1 Procédures expérimentales

Préparation d'une banque de mRNA

La préparation de la banque se fait à l'aide d'un kit *TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation kit* d'Illumina. Elle comprend 7 étapes :

1. La sélection des ARN polyadénylés sur bille magnétique oligo(dT).
2. La fragmentation chimique des ARN sélectionnés.
3. La synthèse du premier brin de cDNA (random primers + SuperScript II) en présence d'actinomycine D afin de bloquer la synthèse du second brin.
4. La synthèse du second brin de cDNA en remplaçant le dTTP par du dUTP afin de bloquer la synthèse du second brin lors de l'étape d'amplification par PCR.
5. L'ajout d'une base A à ces extrémités.
6. La ligation d'adaptateurs à ces extrémités.
7. Une étape d'amplification par PCR. Cette étape permet aussi une sélection puisque seuls les fragments portant les deux types d'adaptateurs (cf étape 6) seront amplifiés.

La validation de la banque est effectuée qualitativement et quantitativement sur puce Agilent DNA 1000 ainsi que par qPCR (Applied Biosystems 7500 avec chimie du SYBR Green).

Génération des clusters et hybridation du primer de séquençage

Les différentes étapes qui vont suivre sont réalisées à l'intérieur d'une *flow-cell* sur un appareil appelé *cBot* à l'aide d'un kit *cluster generation kit* d'Illumina.

La *Flow-cell* est une lame de verre sur laquelle sont coatées de façon covalente des séquences d'ADN complémentaires de celles des adaptateurs qui ont été ajoutées aux fragments d'ADN lors de la constitution de la banque. Chaque *Flow-cell* possède 8 pistes et permet donc de traiter 8 banques ou pools de banques en même temps de façon indépendante.

La piste 4 est réservée au contrôle PhiX.



La *cBot* est composée d'un bloc chauffant/refroidissant qui accueille la *Flow-cell* et d'une partie qui va accueillir les réactifs. Un système de pompe et de tubulure permet d'amener les réactifs à la *Flow-cell* et de les injecter dans chaque piste.

Cette *cBot* permet de réaliser 5 étapes qui sont, dans l'ordre chronologique :

1. l'hybridation des fragments d'ADN constituant la banque à la *Flow-cell*
2. l'amplification de ces fragments une fois fixés à la *Flow-cell*. Cette amplification est isotherme et est rendue possible par la formation de *ponts* d'ADN. Elle permet la génération de clusters d'ADN (population clonale de fragments d'ADN)
3. la linéarisation des sus-dit *ponts* d'ADN
4. le blocage de l'extrémité libre des fragments d'ADN fixés à la *Flow-cell*
5. la dernière étape correspond à l'hybridation du primer de séquençage sur l'extrémité libre des fragments d'ADN fixés à la *Flow-cell*

L'optimisation du séquençage qui aura lieu lors de l'étape suivante est intimement liée à la densité des clusters présents sur la *Flow-cell* à l'issue des 5 étapes décrites ci-dessus.

Les banques ou pools de banques sont dénaturées puis diluées à 7,5 pM avant d'être injectées (90µl par banque ou pool de banques) et hybridées à la *Flow-cell*.

1.2 Le séquençage

Il est réalisé sur un *HiSeq 2000* d'Illumina grâce à la technique *SBS* (Sequence By Synthesis). Il s'agit de l'incorporation et de la détection séquentielle de nucléotides par polymérisation en se servant des clusters d'ADN fixés à la *Flow-cell* comme matrice. Chaque type de nucléotide qui va permettre cette réaction est marqué avec un fluorochrome (émettant après excitation à une longueur d'onde donnée) et un agent bloquant qui empêchera l'incorporation de plusieurs nucléotides lors d'un même cycle de SBS.

La partie optique du séquenceur est constituée de 2 lasers, de 2 filtres et de 4 caméras numériques (une par nucléotide).

A la fin de chaque cycle de SBS, un tampon de clivage sera injecté dans chaque piste, permettant la coupure du fluorochrome et de l'agent bloquant pour chaque nucléotide incorporé. Ceci permettra l'incorporation d'un nouveau nucléotide lors du cycle suivant.

On peut donc décrire chaque cycle de SBS comme suit :

- lavage
- incorporation d'un nouveau nucléotide
- lavage
- détection
- lavage
- clivage



Contact expérimental : [Rachid KOUAL](#), [Sabine NIDELET](#), [Hugues PARRINELLO](#), [Dany SEVERAC](#)

Contact bioinfo : [Emeric DUBOIS](#), [Stéphanie RIALLE](#), [Marine ROHMER](#), [Marc TAUZIN](#)

Mail: mgx@mgx.cnrs.fr Web: <http://www.mgx.cnrs.fr>

Chaque piste (Lane) de la *Flow-cell v3* est divisée en trois colonnes ou Swaths, correspondant à la largeur de balayage de la caméra. La caméra lit en continue la fluorescence, le laser rouge précédant le laser vert. Le logiciel HiSeq Control Software (HCS) divise 1 Swath en 16 portions (Tiles) pour l'analyse d'images. Au total, on aura 96 tiles par piste soit 48 par face (Top et Bottom).

Le contrôle de la qualité du run de séquence se fait à l'issue du premier cycle, une fois la première base incorporée. Un rapport est alors généré sur l'analyse de cette *première base* permettant ainsi d'estimer :

- la densité en cluster sur chaque piste de la *Flow-cell*
- l'intensité du signal généré
- la qualité du focus de l'appareil

Ce focus est réalisé de façon automatique et dynamique.

Références internes à la plateforme

n° du RUN	ID FlowCell
0421	AC3VEKACXX
0431	AC4W4TACXX
0432	Bc506macxx

2 Pré-traitement informatique

Analyses d'images Les analyses d'images sont réalisées avec le logiciel HiSeq Control Software (HCS) d'Illumina. L'analyse d'images identifie la position des clusters, leurs intensités et le bruit associé.

Base Calling Le basecalling est réalisé par le logiciel RTA fourni par Illumina. Cette étape permet de corriger les intensités et de transformer l'intensité en base nucléotidique. Cette phase se décompose en 3 étapes :

- les images sont tout d'abord corrigées pour tenir compte du recouvrement des spectres d'émission des 4 fluorophores.
- les images subissent ensuite une déconvolution afin d'optimiser le signal de chaque pixel
- la conversion des intensités de fluorescence à chaque longueur d'onde en base nucléotidique est ensuite réalisée, en tenant compte, cluster par cluster, d'un éventuel déphasage de la synthèse d'ADN lors des cycles précédents.

Démultiplexage Avant démultiplexage, les séquences issues de vos échantillons sont mélangées avec celles du spike de PhiX (contrôle illumina, index "TTAGGC"). Ce dernier constitue environ 1% de la quantité totale.

Les échantillons Sample_75 et Sample_99 partagent le même index que celui du contrôle PhiX. Les autres ne partagent pas le même index.

Le génome du PhiX est disponible à l'adresse suivante :

"<http://www.mgx.cnrs.fr/project/attachments/2502/phix.fa>".

Ce contrôle illumina permet d'obtenir des séquences de meilleure qualité car il permet :

- d'estimer le phasing/prephasing (pour le basecalling)
- de créer la "frequency cross-talk matrix" (pour le basecalling)



Contact expérimental : [Rachid KOUAL](#), [Sabine NIDELET](#), [Hugues PARRINELLO](#), [Dany SEVERAC](#)

Contact bioinfo : [Emeric DUBOIS](#), [Stéphanie RIALLE](#), [Marine ROHMER](#), [Marc TAUZIN](#)

Mail: mgx@mgx.cnrs.fr Web: <http://www.mgx.cnrs.fr>

3 Description de la manip et résultat

Trois runs ont été réalisés : 60 échantillons ont été multiplexés en trois pools de 12. Chaque pool a été séquencé sur trois pistes.

Les figures de la section suivante sont obtenues avec FastQC, logiciel libre dédié au contrôle qualité des données issues de séquençage haut-débit.

3.1 Analyse qualité de la piste contrôle

La piste 4 est réservée au contrôle PhiX.

Run 421 :

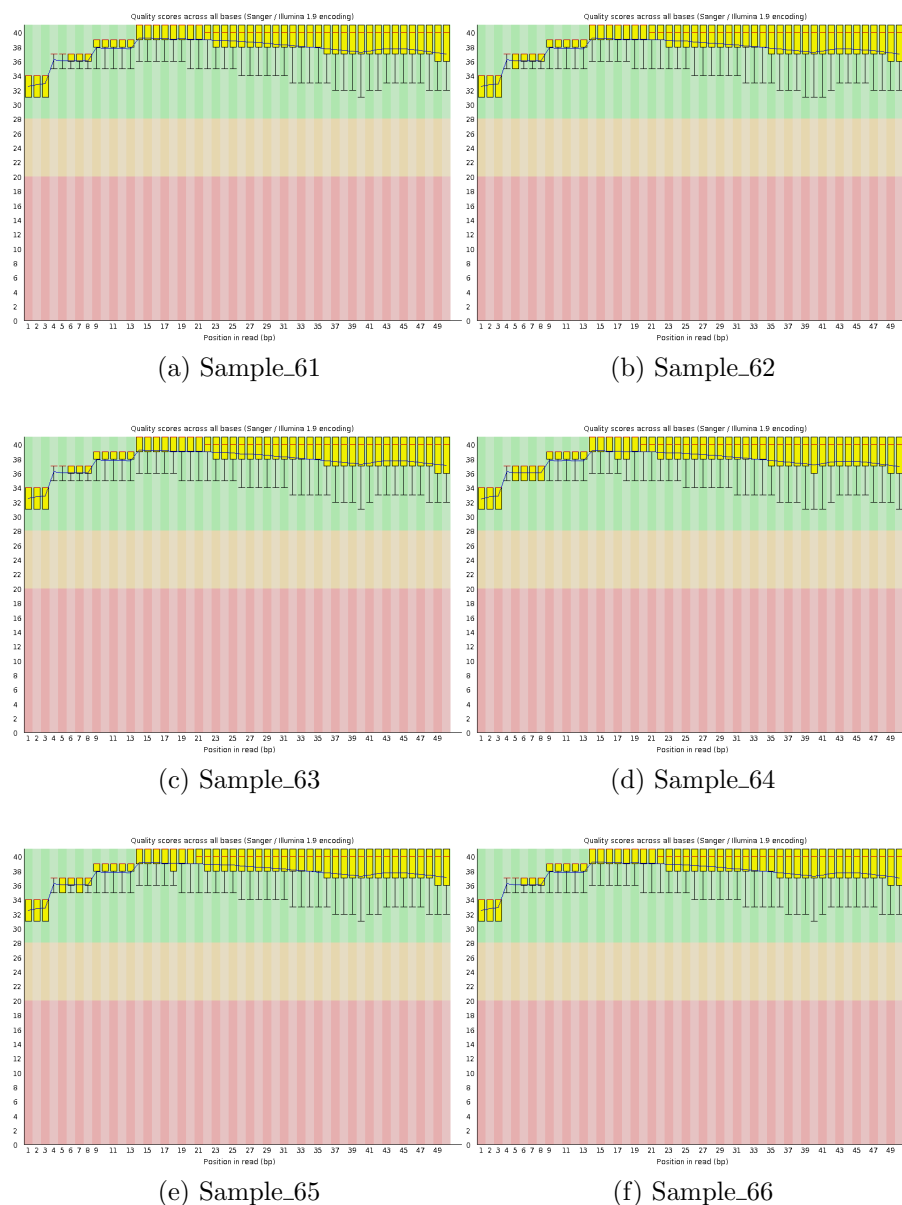


FIGURE 4 – Qualité par base



Contact expérimental : [Rachid KOUAL](#), [Sabine NIDELET](#), [Hugues PARRINELLO](#), [Dany SEVERAC](#)

Contact bioinfo : [Emeric DUBOIS](#), [Stéphanie RIALLE](#), [Marine ROHMER](#), [Marc TAUZIN](#)

Mail: mgx@mgx.cnrs.fr Web: <http://www.mgx.cnrs.fr>

Pour les différentes pistes séquencées, la qualité des bases pour les différents cycles est très bonne.

La piste 8 du run 432 a aux alentours de 10% des séquences qui présentent une baisse de qualité sur la dernière base.

3.2.2 Qualité des séquences

Les figures suivantes montrent que la très grande majorité des séquences pour les différents échantillons a une très bonne qualité.

Run 421 :

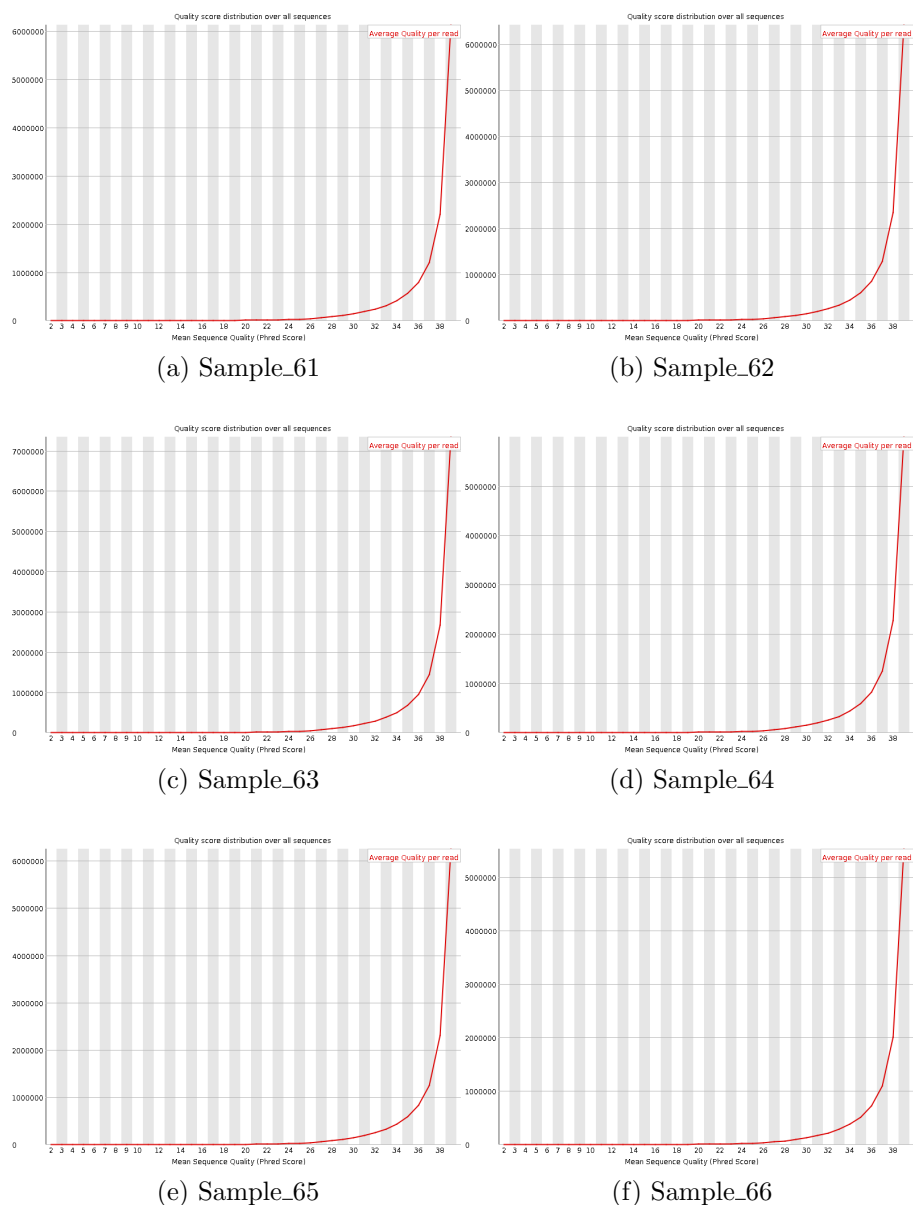


FIGURE 34 – Distribution des scores moyens de qualité par séquence



Contact expérimental : [Rachid KOUAL](#), [Sabine NIDELET](#), [Hugues PARRINELLO](#), [Dany SEVERAC](#)

Contact bioinfo : [Emeric DUBOIS](#), [Stéphanie RIALLE](#), [Marine ROHMER](#), [Marc TAUZIN](#)

Mail: mgx@mgx.cnrs.fr Web: <http://www.mgx.cnrs.fr>

3.2.3 Teneur en base N

Les figures suivantes montrent qu'aucun cycle n'est affecté par la perte de bases.

Run 421 :

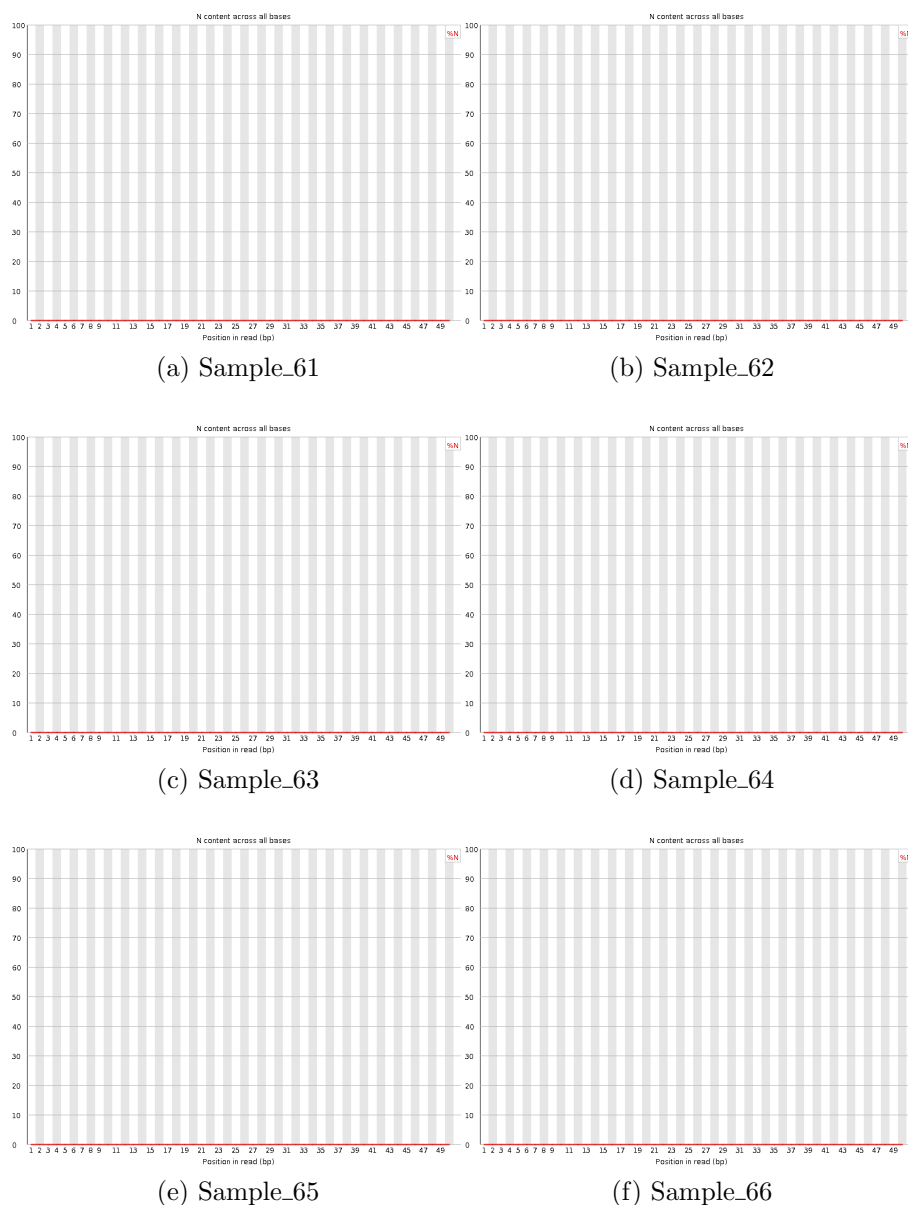


FIGURE 64 – Pourcentage de bases "N" par cycle

3.2.4 Recherche de contaminants

Nous utilisons le logiciel de recherche de contaminants FastQ Screen, qui permet de tester l'alignement d'un grand jeu de données sur différents génomes représentant de potentielles sources de contamination. Le logiciel génère un graphique montrant les proportions de reads s'alignant sur les différents génomes testés.

FastQ Screen utilise l'aligneur Bowtie2. L'alignement est réalisé sur un sous-ensemble des séquences de chaque échantillon.

Les espèces testées sont les suivantes, dans l'ordre d'apparition sur le graphe résultat : le génome humain (Hg19), *Mus musculus* (Mm9), *Rattus norvegicus* (R_norvegicus), *Drosophila melanogaster* (Dm3), *Arabidopsis thaliana* (A_thaliana), *Bos taurus* (Bos_tau6), *Canis familiaris* (C_familiaris), *Gallus gallus* (G_gallus), *Caenorhabditis elegans* (C_elegans), *Saccharomyces cerevisiae* (S_cerevisiae), *Candida albicans* (C_albicans), *Escherichia coli* (E_coli), *Streptococcus pyogenes* (S_pyogenes), *Bacillus cereus* (B_cereus), *Chlamydia trachomatis* (Chlamydia), *Enterococcus faecalis* (Enterococcus), *Propionibacterium acnes* (P_acnes), *Salmonella enterica* (Salmonella), *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis* (Staphylococcus), et un ensemble de Mycoplasmes. Le PhiX et les adaptateurs Illumina TruSeq (RNA-seq & small RNA-seq) sont également testés.

Les figures suivantes montrent le résultat obtenu pour chacun des échantillons.

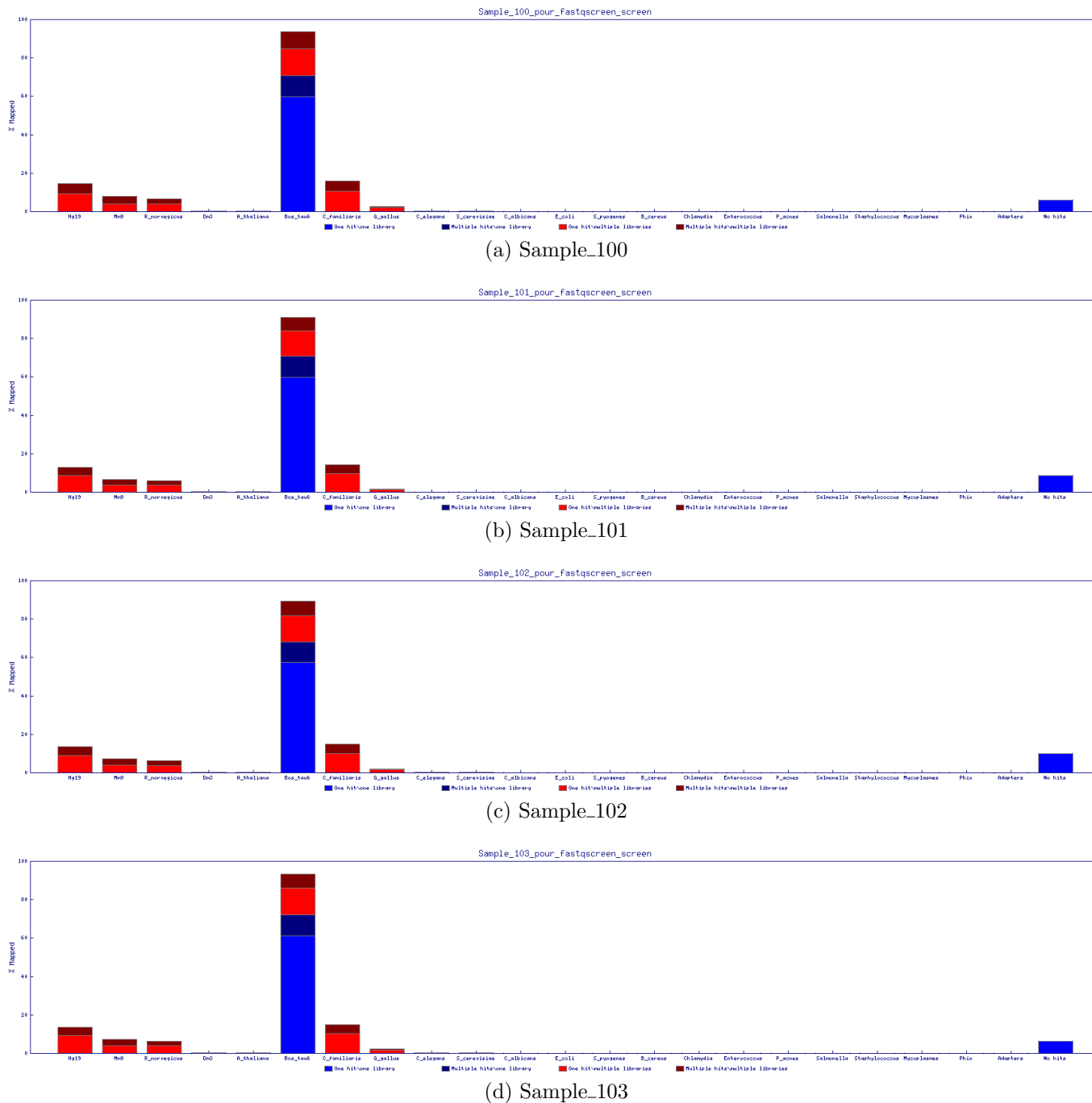


FIGURE 94 – Résultats FastQ Screen - alignement sur les différents génomes



Contact expérimental : [Rachid KOUAL](#), [Sabine NIDELET](#), [Hugues PARRINELLO](#), [Dany SEVERAC](#)

Contact bioinfo : [Emeric DUBOIS](#), [Stéphanie RIALLE](#), [Marine ROHMER](#), [Marc TAUZIN](#)

Mail: mgx@mgx.cnrs.fr Web: <http://www.mgx.cnrs.fr>

La proportion de reads apparaissant en bleu sur les graphes correspond aux séquences qui se sont alignées spécifiquement sur un génome.

Les barres en rouge et marron correspondent aux séquences qui se sont alignées sur plusieurs génomes à la fois, en raison de l'homologie de séquences.

Les échantillons Sample_75 et Sample_99 partagent le même index que celui du contrôle PhiX, d'où la présence de séquences alignées sur ce génome. Les séquences de PhiX seront éliminées lors de l'alignement.

Aucune contamination n'est mise en évidence.

3.3 Résultats du séquençage

Ci-dessous un tableau récapitulant les informations :

CB : Nombre de Clusters Bruts

CAF : Nombre de Clusters après le passage des filtres

3.3.1 Nombre de séquences par échantillon sur une piste pour le run 421

Echant \ Info	Piste	CB	CAF	% (/CB)
Sample_61	1	13 610 098	12 677 420	93.15
Sample_62	1	14 436 200	13 424 661	92.99
Sample_63	1	16 463 433	15 248 254	92.62
Sample_64	1	13 779 796	12 815 760	93.00
Sample_65	1	14 080 887	13 111 910	93.12
Sample_66	1	12 325 211	11 490 554	93.23
Sample_67	1	14 825 903	13 678 732	92.26
Sample_68	1	14 407 267	13 332 687	92.54
Sample_69	1	17 291 006	16 057 798	92.87
Sample_70	1	15 973 198	14 803 130	92.67
Sample_71	1	19 220 605	17 933 104	93.30
Sample_72	1	15 367 201	14 284 563	92.95
Sample_73	2	13 004 226	11 740 403	90.28
Sample_74	2	18 948 485	17 206 500	90.81
Sample_75	2	10 993 145	9 892 382	89.99
Sample_76	2	28 624 700	25 819 499	90.20
Sample_77	2	11 113 584	10 076 183	90.67
Sample_78	2	34 384 086	31 081 463	90.39
Sample_79	2	11 188 439	10 144 157	90.67

Annexe 7

Rapport de la première session ordinaire d'examen de projet du comité d'éthique institutionnel
du 31 janvier 2013.

N/Réf. A002-2013/CE-CM

Bobo-Dioulasso, le 31 janvier 2013

Avis d'examen d'un Projet de Recherche

1. Numéro d'enregistrement du projet de recherche :

002-2013/CE-CM

2. Intitulé du Projet de recherche :

« Dossier pour expérimentation animale » du projet global « Caractérisation des bases moléculaires de la tolérance à la trypanosomose animale africaine : analyse conjointe des transcriptomes de l'hôte bovin et du parasite.

3. Investigateur Principal

Dr David BERTHIER

4. Avis du Comité d'Ethique

Avis favorable du Comité à l'exécution du projet de recherche

5. Durée de validité :

1 an à partir de la date d'approbation

6. Liste des membres présents :

1. *Dr Abdoulaye OUEDRAOGO (Président)*
2. *Dr Diane VALEA*
3. *Dr Hervé KPODA*
4. *Dr Rasmané BÉOGO*
5. *Mme Martine SOMDA*
6. *Mme Odile Hato ZAMPA*
7. *Mr Cyprien DABIRE*
8. *Dr Dezemon ZINGUE (Secrétaire)*

Le Président



Dr. Abdoulaye OUEDRAOGO



Comité d'Ethique

N /Réf.002-2013/CE-CM

Bobo Dioulasso, le 31 Janvier 2013

**RAPPORT DE LA PREMIERE SESSION ORDINAIRE
D'EXAMEN DE PROJET DU COMITE D'ETHIQUE
INSTITUTIONNEL, 31 /01/13**

Le jeudi 31 janvier 2013, s'est déroulée la première session ordinaire d'examen de projets de recherche dans la salle de réunion de l'IRSS/DRO.

L'ordre du jour de cette session était :

- Examen de projets de recherche
- Divers

Quatre projets ont été soumis au Comité d'Ethique Institutionnel pour évaluation et avis. Il s'agissait des protocoles de recherche suivants :

- « Dossier pour expérimentation animale » du projet global « Caractérisation des bases moléculaires de la tolérance à la trypanosomose animale africaine : analyse conjointe des transcriptomes de l'hôte bovin et du parasite »
- « Réponses immunitaires innées dans des populations avec différentes susceptibilités au paludisme »
- « Transfert et évaluation de nouvelles techniques de diagnostic rapide de la tuberculose et des résistances au Centre MURAZ ; BURKINA FASO » Projet WANETAM-TB
- CohMSM : « Prévention de l'infection par le VIH chez les hommes qui ont des relations sexuelles avec d'autres hommes en Afrique subsaharienne : étude de faisabilité d'une cohorte incidente multicentrique »

Les membres du comité d'éthique présents à cette séance étaient :

1. **Dr Abdoulaye OUEDRAOGO (Président)**
2. **Dr Diane VALEA**
3. **Dr Hervé KPODA**
4. **Dr Rasmané BÉOGO**
5. **Mme Martine SOMDA**
6. **Mme Odile Hato ZAMPA**
7. **Mr Cyprien DABIRE**
8. **Dr Dezemon ZINGUE (Secrétaire)**

Membres absents excusés : Mr Abdramane BERTHE, Dr Germain TRAORE et Dr Léa PARE

Le quorum de participation des membres du CEI à ladite session était de 8/11

I. Examen de projet

Projet 1 : Dossier pour expérimentation animale » du projet global « Caractérisation des bases moléculaires de la tolérance à la trypanosomose animale africaine : analyse conjointe des transcriptomes de l'hôte bovin et du parasite

Responsable scientifique : **Dr David BERTHIER**

Présentateur : **Dr Guiguibaza-Kossigan DAYO**, Investigateur Principal dans l'étude/CIRDES

Le but de cette étude est d'étudier les bases moléculaires de la tolérance/sensibilité à la trypanosomose africaine due à *Trypanosoma congolense* chez 5 races bovines d'Afrique de l'Ouest. Le code de l'essai est : 12AATTOL01.

La phase expérimentale du projet a pour objectifs la collecte et l'analyse des données cliniques et biologiques de bovins (5 races), avant, pendant et après leur infection expérimentale par *Trypanosom congolense*. La durée de cette phase est de 4,5 mois.

Les documents fournis au CEI étaient :

- Synopsis du protocole (rédigé le 25/07/2012) et budget
- Formulaire de consentement destiné aux éleveurs (sans numéro de version)
- Fiches d'information destinée aux éleveurs (sans numéro de version)
- Protocole complet du projet global « Caractérisation des bases moléculaires de la tolérance à la trypanosomose animale africaine : analyse conjointe des transcriptomes de l'hôte bovin et du parasite » (ANR-GUI-AAP-04-Doc Scientifique 2011)
- CV des investigateurs

Les Principales questions débattues

Les questions débattues ont concerné entre autres :

- Motivation du choix des bovins mâles uniquement
- Devenir des animaux après l'expérimentation (vente ou élevage à la ferme expérimentale du CIRDES ?)
- Date de début de l'étude
- Intérêt du recueil du consentement des vendeurs lors de l'achat des bovins
- Utilisations de termes très techniques dans la notice d'information et le manque d'information sur les risques et bénéfices de l'étude
- Sécurité de l'expérimentation pour les humains (risques d'infection pour les chercheurs et la population ; possibilité de mutation des germes après expérimentation)
- Sécurité de l'expérimentation pour les animaux (volume et fréquence des prélèvements sanguins ; plan de prise en charge des bovins en cas d'effet indésirable grave ; contamination des autres animaux etc.)
- Est-ce que la vente de cette variété est faite volontairement par les éleveurs ?
- Est-ce que les animaux ont été achetés avant la soumission au CEI

Recommandations :

- Revoir la fiche d'information et utiliser des termes en Français facile.
- Faire apparaître le titre sur la page de garde et synopsis de l'étude

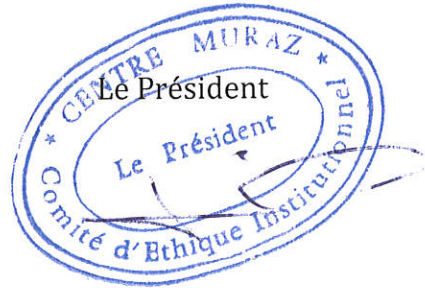
Avis du comité d'éthique

Avis favorable à l'exécution de ce projet

Rapporteur



Dr Dezemon ZINGUE



Dr Abdoulaye OUEDRAOGO

Annexe 8

Schéma du dispositif expérimental basé au Burkina Faso

